FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1919

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

N°

PAR

Auguste DURUPT
Né le 25 Avril 1890, à St-Genest-Lerpt.
Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine de Paris.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DU PROFESSEUR DUPRÉ

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SUR LA

VACCINATION ANTITYPHIQUE

(ÉTUDE SUR LES VARIATIONS DU POUVOIR IMMUNIGÈNE DU PARA B)

Président : M. E. DUPRÉ, *Professeur*.

PARIS
LIBRAIRIE LITTÉRAIRE ET MÉDICALE
2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE

1919

Faculté de Médecine de Paris

LE DOYEN : M. ROGER — ASSESSEUR : M. POUCHET

	PROFESSEURS MM.
Anatomie	NICOLAS
Anatomie topographique	N.
Physiologie	CH. RICHET
Physique médicale	WEISS
Chimie organique et Chimie générale	DESGREZ
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	N.
Pathologie et Thérapeutique générales	ACHARD
Bactériologie	BEZANCON
Pathologie interne	VAQUEZ
Pathologie chirurgicale	N.
Anatomie pathologique	LETULLE
Histologie	PRENANT
Opérations et appareils	N.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET
Thérapeutique	CARNOT
Hygiène	I.
Médecine légale	N.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	N.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER
Clinique médicale	WIDAL GILBERT CHAUFFARD N.
Maladies des enfants	HUTINEL
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	DUPRÉ
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JEANSELME
Clinique des maladies du système nerveux	PIERRE MARIE
Clinique chirurgicale	PIERRE DELBET QUENU LEJARS HARTMANN
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires	LEGUEU
Clinique d'accouchements	BAR COUVELAIRE RIBEMONT-DESSAIGNES
Clinique gynécologique	N.
Clinique chirurgicale infantile	AUGUSTE BROCA
Clinique thérapeutique	ALBERT ROBIN
Hygiène et clinique de la 1re enfance	MARFAN.
Clinique des maladies infantiles	TEISSIER

Agrégés en exercice

MM.

ALGLAVE	GUILLAIN	LOEPER	ROUSSY
BERNARD	JEANNIN	MAILLARD	ROUVIERE
BRANCA	JOUSSET (A.)	MOCQUOT	SCHWARTZ (A
BRUMPT	LABBE (HENRI)	MULON	SICART
CAMUS	LAIGNEL-LAVASTINE	NICLOUX	TANON
CASTAIGNE	LANGLOIS	NOBECOURT	TERRIEN
CHAMPY	LECENE	OKINCZYC	TIFFENEAU
CHEVASSU	LEMIERRE	OMBREDANNE	VILLARET
DESMAREST	LENORMANT	RATHERY	ZIMMERN
GOUGEROT	LEQUEUX	RETTERER	
GREGOIRE	LEREBOULLET	RIBIERRE	
GUENIOT	LERI	RICHAUD	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES PARENTS

Témoignage d'affection.

À mon Frère Jean DURUPT

Docteur en pharmacie de l'Université de Lyon.

A mon Frère Lucien DURUPT

Ingénieur civil des Mines.

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR E. DUPRÉ

Professeur de Clinique psychiatrique à la Faculté de Médecine de Paris.
Médecin de l'Hôpital Ste-Anne
Membre de l'Académie de Médecine,
Officier de la Légion d'Honneur.

A la Mémoire de mon Maitre

Le Professeur DÉJERINE

En reconnaissance de l'affection qu'il nous portait.

A Madame DÉJERINE-KLUMPKE

Chevalier de la Légion d'Honneur

Dont l'influence sur notre esprit a été si grande.

A Mon Maitre

Le Docteur ANDRÉ-THOMAS

Médecin de l'hôpital Saint-Joseph

Qui guida nos premiers pas dans les laboratoires et fut toujours pour nous le plus précieux conseiller et le plus sûr ami.

A Mon Ami

Le Docteur J. JUMENTIÉ

Ex-Chef de Laboratoire et de clinique à la Faculté.

A Mes AMIS

INTRODUCTION

Si l'on étudie la vaccination antityphique, on est tout d'abord frappé, en faisant l'historique de la question, de voir le nombre de méthodes qui ont été successivement proposées au praticien. Il n'est pas un auteur, dont le vaccin préparé de façon différente des autres, n'ait offert de meilleurs résultats que ceux employés avant lui. Actuellement encore où la vaccination est entrée dans le domaine prophylactique courant, plusieurs vaccins se disputent les faveurs du public médical.

Sans doute les raisons d'une pareille concurrence doivent être recherchées, dans l'impossibilité où se trouve le médecin de faire un choix judicieux et l'imperfection même des produits qui lui sont offerts.

Tous les vaccins étudiés par les auteurs sont immunisants, mais il en est de dangereux et d'inoffensifs. Après avoir rejeté les premiers, il reste à chercher parmi les seconds lequel est le plus immunisant. C'est une étude critique de tous les vaccins qui s'imposerait, une étude parallèle et rigoureusement scientifique.

On nous objectera que cette étude est faite, que les statistiques sont éloquentes, qu'il n'est pas besoin

de méthodes compliquées pour établir que tel vaccin est meilleur que tel autre. Il suffit de les employer, de voir les résultats et les pourcentages fournis : cela s'appelle « les preuves épidémiologiques ». Un tel argument implique la foi dans les statistiques ; pour nous, cette façon de résoudre le problème ne nous paraît pas à l'abri de l'erreur.

Il aurait été évidemment plus facile de faire le total des individus vaccinés par la méthode de Vincent, de Wright, de Widal, de Le Moignic et Césari, etc..., de rechercher le nombre de cas de dothiénentérie observés chez les uns et chez les autres, de mettre en numérateur ce dernier chiffre, en dénominateur le premier et de donner la prime au vaccin qui fournirait la plus petite fraction.

Il n'est pas une intelligence qui soit satisfaite par un tel procédé d'investigation, parce qu'il n'est pas un esprit qui ne sache avec quelle légèreté sont établies les statistiques les plus officielles.

Nous avons préféré chercher si l'immunité ne pouvait être dosée autrement que par les chiffres périodiques donnés par les bureaux administratifs. Il nous est immédiatement apparu que la production d'anticorps qui suivait l'immunisation et qui était pour elle un moyen de diagnostic pouvait également devenir un moyen de mesure.

En étudiant les travaux publiés dans ce sens, nous avons constaté que d'importantes recherches avaient été faites.

Nous ne pouvons pas ne pas citer dès maintenant le

nom de M. Nicolle qui, en France, est un de ceux qui ont poussé le plus loin l'étude des réactions antigènes de certains microbes. Le même auteur a publié en collaboration avec plusieurs autres des travaux remarquables sur les bacilles typhiques et paratyphiques.

Nous ne saurions refaire les expériences de M. Nicolle ; elles sont définitives, et c'est un bonheur pour nous d'avoir su au contraire les considérer comme une base solide de laquelle nous pouvions « partir ».

Nous savons maintenant qu'on peut obtenir l'immunité avec n'importe quelle préparation bactérienne, avec n'importe quelle race de bacilles de n'importe quelle provenance. On a pu employer toute la gamme comprise entre les bacilles vivants et une poudre desséchée de bacilles morts et broyés.

Ces résultats présentent un grand intérêt, mais on conçoit qu'il reste encore à résoudre un certain nombre de problèmes importants. Il faut pousser plus loin l'étude de ces différents antigènes, et à côté des épreuves qualitatives, établir des épreuves quantitatives.

En d'autres termes, il était utile de savoir si toutes les races de bacilles pouvaient être employées dans la vaccination bactérienne, si toutes les préparations pouvaient créer l'immunité. La réponse est affirmative à ces deux questions. Nous en posons à notre tour une autre plus précise : « *Des préparations bactériennes différentes utilisées comme antigènes créent-elles une égale immunité dans le même laps de temps* » ?

On conçoit tout l'intérêt qui s'attache à la réponse à cette question, c'est la critique expérimentale des vac-

cins, la contre-épreuve des preuves épidémiologiques qu'apporte chacun d'eux.

C'est une partie de ce travail que nous avons eu pour but. Conscient des difficultés, qui allaient s'offrir à nous, nous nous mîmes à l'œuvre avec la ferme volonté d'en triompher et d'apporter ainsi notre modeste contribution à l'étude de la vaccinothérapie bactérienne.

Nous sommes parti d'un échantillon de bacilles Para B dont nous avons soigneusement étudié d'abord les « caractères généraux ». Cet échantillon était de vieille souche, offrait les meilleures garanties de stabilité : il servait à préparer du vaccin pour l'armée depuis plusieurs années. Nous nous sommes malgré cela assuré de sa légitimité biologique. Nous avons étudié sa virulence pour le cobaye : il s'est montré nettement virulent.

Nous avons cherché la dose limite de bacilles susceptible, en injection sous-cutanée, de laisser vivre un cobaye de 500 grammes environ, de santé robuste.

Cette dose a été évaluée à 40 millions de microbes ; avec une dose plus forte on tue l'animal, qui meurt en 24, 48 heures ou plusieurs jours, avec une bacillémie intense, nécrose en foyers de la rate et du foie.

Ces données étant acquises, nous nous sommes mis à établir des vaccins contenant tous 40 millions de bacilles mais préparés de façons différentes (bacilles vivants, bacilles lavés, bacilles chauffés à des températures variées, bacilles tués par des antiseptiques).

Ces vaccins ont été injectés sous la peau de cobayes sains que nous avons observés pendant 18 jours et sacrifiés au bout de ce temps,

L'autopsie de chaque animal a été suivie de l'examen histologique des viscères et de l'examen du sérum.

Dans ces différents sérums, nous avons dosé les agglutinines, ce qui nous a donné le pouvoir agglutinogène de chaque vaccin.

Nous avons ensuite cherché et établi une méthode de dosage des lysines. Nous avons évalué quantitativement ces substances dans chaque sérum, ce qui nous a donné le pouvoir lysogène de chaque vaccin.

Tel est l'exposé rapide de notre travail.

Nous fûmes lancé dans cette voie et guidé par le Docteur Césari, Directeur du Service du lipo-vaccin à l'Institut Pasteur. Nous lui devons non seulement l'idée, mais de précieux conseils qui n'ont pas peu contribué à mener à bien ce travail ; nous le prions d'accepter nos plus vifs remerciements. Sans s'en douter, M. Nicolle nous a rendu de très réels services, nous l'en remercions et espérons qu'il ne portera pas sur notre travail un jugement trop sévère.

Notre Maître, le Professeur Dupré, nous a ouvert les portes de son laboratoire et nous a permis d'y entreprendre ce travail. L'intérêt qu'il nous a porté, fut pour nous un encouragement précieux.

Ceux qui peuvent admirer l'esprit scientifique et la profonde érudition biologique du Professeur de clinique psychiatrique ne se trouveront nullement étonnés de le voir présider une thèse de bactériologie. Nous lui sommes profondément reconnaissant de l'honneur qu'il nous fait en acceptant cette présidence et le prions de trouver ici l'hommage respectueux de notre profonde affection.

AVANT-PROPOS

Au cours de ce travail, nous avons eu avec des amis qui trouvaient de l'intérêt à la question traitée par nous, des conversations, des échanges de vues. Tantôt, nous leur faisions part de nos résultats, tantôt nous leur exposions nos desseins.

Au cours de ces conversations, un fait nous a frappé singulièrement : c'est la constatation que nous avons pu faire de voir combien les termes employés journellement en bactériologie présentaient des sens différents dans les bouches des divers auteurs.

Nous nous sommes convaincu que des gens très distingués et érudits donnaient à des mots un sens parfois très éloigné de leur sens propre.

Pour éviter des discussions inutiles, il nous paraît nécessaire de fixer le sens des termes que nous employons une fois pour toutes. Cette précaution est indispensable pour être compris des auteurs qui liront notre travail. Nous avons pu constater que M. Nicolle dans un de ses Mémoires prenait la même précaution que nous, probablement parce qu'il en avait aussi reconnu l'impérieuse nécessité.

Nous avons appelé *virulence*, la faculté pour un microbe de se développer dans l'organisme animal, d'y vivre et se multiplier ; *pouvoir pathogène*, la faculté d'engendrer des troubles morbides, *pouvoir agglutinogène*, la possibilité d'engendrer des agglutinines. Enfin, d'autres termes se définissent d'eux-mêmes, et nous n'avons pas besoin, pensons-nous, de donner la signification que nous attachons à *pouvoir immunigène*, *toxigène*, *lysogène, lysopoïetique*.

CHAPITRE I[er]

ÉTUDES DES REACTIONS IN VITRO DES SÉRUMS DES IMMUNISÉS

I. — Considérations générales.

Si l'on injecte à des animaux vivants, de petites doses de bactéries pathogènes de cellules ou de poisons solubles d'origine albuminoïde, incapables de provoquer leur mort on détermine chez eux une résistance particulière vis-à-vis de ces poisons vivants ou solubles qui représente ce qu'on appelle l'immunité active.

Phénomène de Pfeiffer. — Pfeiffer a montré que si l'on introduit dans le péritoine d'un lapin vacciné contre le choléra une culture de vibrion cholérique, et qu'on retire une partie de la culture injectée au bout de 10, 20 ou 30 minutes, on voit ces germes subir une transformation particulière, et évoluer vers la destruction complète. Ils s'ovalisent d'abord, deviennent ronds et granuleux ensuite, pour finalement se désorganiser complètement.

Le lapin a donc détruit les vibrions, et cette propriété bactéricide lui a été conférée par la vaccination. L'immunité n'est donc pas une accoutumance, c'est une exaltation des moyens de défense.

L'étude de ce phénomène qui doit être rappelé à la base de tout exposé de l'immunité acquise, a été complétée par de nombreux auteurs; on a même réalisé le phénomène *in vitro* sans l'intervention de l'organisme animal, simplement avec du choléra-sérum. On a vu alors sous son influence les vibrions dans le tube à essai s'agglutiner d'abord, se lyser ensuite progressivement.

Aux substances qui provoquent le premier phénomène : l'agglutination, on a réservé le nom d'agglutinines; à celles à qui incombe plus spécialement le rôle de destruction, on a donné celui de bactériolysines, bactériotropines, etc.

Si, au lieu d'avoir immunisé l'animal contre une bactérie pathogène, on l'avait immunisé contre un poison soluble azoté, on aurait déterminé *in vitro* avec le sérum de l'animal, la précipitation de cette solution ; on a appelé précipitines, les substances capables de produire ce phénomène.

Enfin, d'autres substances ont été individualisées plus ou moins nettement dans les immun-sérums, on leur a donné des noms divers; nous ne retiendrons que les opsonines ou stimulines qui ont fait l'objet de nombreux travaux.

Nous allons étudier successivement les quatre substances que nous venons d'indiquer : agglutinines, pso-

nines, précipitines, bactériolysines ; nous exposerons leurs propriétés et l'intérêt qui s'attache à chacune d'elles.

Notre attention s'arrêtera surtout dans les agglutinines et les lysines qui constituent à notre avis les réactions les plus intéressantes des sérums des immunisés.

II. — Agglutinines.

Les sérums normaux des individus sains et la plupart des humeurs animales présentent assez souvent des propriétés agglutinantes qu'on peut mettre en évidence *in vitro*. Ces agglutinines générales pour la plupart des corps étrangers microscopiques, pathogènes, de nature albuminoïde, paraissent avoir une intensité très variable et s'exercer de façon très irrégulière dans des sens différents sans que l'on puisse déceler les raisons de leur orientation. Le sérum normal de chèvre serait agglutinant pour les hématies de l'homme et du lapin ; le sérum de lapin serait légèrement agglutinant pour le bacille typhique et le vibrion cholérique.

On peut supposer que ces agglutinines qui préexistent dans le sérum d'individus normaux à des degrés divers et en dehors de tout état d'infection sont dues à une certaine puissance naturelle d'immunité, ou peut-être plus justement à des infections légères sans signes cliniques.

Quoi qu'il en soit, l'étude des agglutinines naturelles

présente moins d'intérêt que l'étude des agglutinines acquises.

Ces dernières sont d'ailleurs plus faciles à étudier parce que plus évidentes, plus constantes et plus puissantes. Leurs propriétés sont dès lors plus faciles à mettre en valeur.

Spécificité des agglutinines.

La plus importante des propriétés des agglutinines acquises ou provoquées par l'inoculation bactérienne par exemple est évidemment leur caractère spécifique.

Les infections successives ou même une seule infection de bacilles plus ou moins pathogènes ont pour résultat chez l'être vivant supérieur d'augmenter spécifiquement dans des proportions considérables souvent extraordinaires le pouvoir agglutinant naturel que possèdent les humeurs de l'organisme inoculé vis-à-vis de l'espèce microbienne envisagée.

A tel point que le sérum d'un animal immunisé qui agglutinait antérieurement la plupart des espèces bactériennes n'agglutine plus, à un taux de dilution convenable que l'espèce microbienne contre laquelle il a été préparé. Charrin et Roger paraissent avoir été les premiers (1889) à attirer l'attention sur le phénomène de l'agglutination des microbes sous l'influence du sérum sanguin des animaux vaccinés contre ces microbes. Metchnikoff et ses élèves ont ultérieurement confirmé ces faits. Le caractère spécifique des agglutinines a été ensuite utilisé largement dans les laboratoires aussi

bien dans le séro-diagnostic des maladies que dans le diagnostic d'une espèce microbienne.

C'est Widal, qui avec Sicard, ont été les premiers à utiliser le phénomène de l'agglutination des bacilles d'Eberth pour le diagnostic de la fièvre typhoïde. C'est à la suite des publications de ces deux auteurs que l'étude des agglutinines a pris une ampleur et un intérêt particuliers.

Dans les laboratoires pour avoir entre les mains un réactif spécifique servant au diagnostic d'une espèce microbienne, on a inoculé des animaux, chacun avec une bactérie. On a recueilli leur sérum et on s'en est servi pour différencier par l'agglutination les diverses espèces microbiennes se rapportant aux sérums dont on disposait.

Cette propriété si intéressante des agglutinines qui leur confiait un rôle aussi important, avait été établie par maints auteurs, cependant dès 1895. Bordet en France, Guber et Durham en Angleterre commençaient déjà à faire quelques réserves ; ils déclaraient que le pouvoir agglutinant provoqué artificiellement n'était pas comme on l'avait cru rigoureusement spécifique, mais que son électivité était telle qu'on pouvait s'en servir avantageusement dans certains cas pour distinguer les espèces microbiennes.

En réalité, dans un sérum spécifique, il faut considérer à côté des agglutinines principales, des agglutinines secondaires qui agissent soit sur les microbes voisins du même groupe — elles sont dites coagglutinines ou agglutinines de groupe, — soit sur des microbes très éloignés de l'espèce considérée : ce sont alors les hétéro-agglutinines.

On ne peut donc pas dire que la réaction soit strictement spécifique.

Widal et Sicard ont montré, dès l'année 1897, que le sérum typhique humain agglutine souvent les paratyphiques à un taux très élevé. Wilson dit que le sérum des individus atteints de méningite cérébro-spinale peut agglutiner de 1/50e à 1/100e le bacille typhique et le gonocoque (1).

On sait de plus aujourd'hui que le bacille Flexner se montre d'ordinaire plus sensible au sérum Schiga qu'au sérum Flexner, et cependant ces deux bacilles sont des espèces microbiennes bien distinctes.

D'autre part, Collins a démontré que sous l'influence d'injections de substances chimiques variées, on pouvait obtenir la formation dans le sang des animaux, d'agglutinines déterminées presque spécifiques pour certaines espèces microbiennes. La pancréatine par exemple augmente chez le lapin le pouvoir agglutinant du sérum pour le bacille de la dysenterie type Flexner. L'invertine, le scatol, l'indol produiraient des effets analogues.

Mais, malgré tous ces faits qui semblent mettre en doute les propriétés spécifiques des agglutinines, il n'est pas moins vrai que leur électivité reste un de leurs caractères les plus importants, et qu'à condition de produire l'agglutination avec une méthode déterminée qui permette d'en apprécier la valeur et l'énergie, on peut encore très facilement écarter toutes les causes d'er-

(1) Dopter et Koch. La coagglutination du méningocoque et du gonocoque (*Soc. de Biologie*, 1908 n° 27).

reur et se servir utilement du phénomène soit dans le diagnostic pathologique, soit dans la détermination des espèces microbiennes.

Propriétés physico-chimiques.

Les agglutinines sont des substances relativement stables ; elles résistent généralement à un chauffage à 55°-60°, ne sont détruites qu'au-dessus de 70° (1), ne sont pas modifiées par l'action de la lumière solaire (2), résistent à la dessication et à la putréfaction. On peut faire des séro-diagnostics avec du sang desséché du sérum putréfié. Elles sont arrêtées par les filtres mais passent à travers les membranes dyalitiques (3) ; ces propriétés rapprochent les agglutinines des diastases.

Par d'autres côtés, elles pourraient être assimilées à une substance chimique ; Malvoz (4) a montré que l'aldéhyde formique, l'eau oxygénée, le sublimé, la safranine produisaient une agglutination aussi belle que celle produite avec les meilleurs sérums spécifiques. Blachstein (5) a observé les mêmes faits avec la chrysoïdine sur le vibrion cholérique, mais il est juste de dire d'après Bossaërt (6) que ce phénomène n'aurait ni la netteté, ni la sensibilité qu'on observe avec les sérums spécifiques.

(1) Laveran et Mesnil. *Annales de l'Institut Pasteur*, T. XV, 1907, page 695.
(2) Achard. *Bull. Soc. médicale des Hôp.*, 1896, p. 682.
(3) Eisenberg et Wolk. *Zeitsh für Hygiene*, T. XL, 1902, p. 155-195.
(4) Malvoz. Recherches sur l'agglutination des bacilles typhiques par les substances chimiques. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897.
(5) Blachstein. *Centralblät für Bakt.* 1897, p. 84.
(6) Bossaert. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1878, p. 857.

Phénomène de l'agglutination.

Ces faits tendraient à laisser supposer que l'agglutination est un phénomène vital dû aux microbes, un simple phénomène de défense; il n'en est rien, car les microbes même morts se laissent agglutiner.

L'assimilation qu'on tend à faire de plus en plus des agglutinines aux substances chimiques peut trouver chaque jour de nouvelles raisons pour se justifier. Joos a montré que la présence de chlorure de sodium était absolument nécessaire à l'accomplissement du phénomène de l'agglutination.

Il paraît de plus en plus évident que le phénomène est dû à l'action l'une sur l'autre de deux substances, l'une contenue dans le sérum des immunisés, l'autre contenue dans les corps microbiens, ces deux substances ne réagissant qu'en présence du chlorure de sodium.

L'agglutinine contenue dans le sérum immunisé possède des propriétés thermo-stabiles et physio-chimiques que nous avons indiquées plus haut; elle peut être détruite par certains réactifs chimiques ou par la chaleur à 75°; elle peut être saturée par un excès de l'autre substance (l'agglutinine contenue dans des corps microbiens). Ainsi, lorsqu'à un sérum agglutinant à la fois pour le bacille d'Eberth et le vibrion cholérique, on ajoute une grande quantité de bacilles typhiques, on constate après centrifugation que le sérum a perdu ses propriétés agglutinantes vis-à-vis du bacille d'Eberth, et n'a conservé que celle du vibrion cholérique. Ce phé-

nomène de la *saturation des agglutinines* a reçu une application pratique ces dernières années, et M. Weissenbach l'a utilisé dans le séro-diagnostic de la fièvre typhoïde chez les vaccinés par le vaccin T. A. B.

Toutes ces propriétés de la substance agglutinante contenue dans le sérum des immunités, qui la rapprochent singulièrement d'un corps chimique, se retrouvent à peu de chose près dans la substance contenue dans des bacilles et qui semble réagir contre la première pour provoquer ce phénomène de l'agglutination.

Agglutinations des microbes morts.

Nous avons vu que les microbes morts se laissent agglutiner de la même façon que les bacilles vivants et cela nous a servi d'argument pour écarter la théorie qui fait de l'agglutination un phénomène vital. Mais il y a lieu d'apporter à ce fait quelques compléments d'explications. Il est juste qu'une émulsion de bacilles typhiques chauffés à 55° permet d'observer l'agglutination presque aussi bien que sur des bacilles vivants, qu'on peut également réaliser l'expérience avec une émulsion de bacilles morts par adjonction de quelques gouttes de formol, mais si l'on s'avise de tuer les bacilles par la chaleur à 100° il n'en est plus ainsi et l'on ne peut obtenir dans ce cas qu'une faible agglutination même avec des sérums fortement agglutinants. En d'autres termes, la chaleur à 100° détruit en partie la substance microbienne qui se combinant avec la substance agglutinante du sérum

devait provoquer la réunion des éléments en amas ; cette substance agglutinante microbienne possède donc des propriétés qui la rapprochent de celle contenue dans le sérum; elle est cependant plus résistante puisqu'une température de 100° ne la détruit qu'en partie. On peut débarrasser tout au moins en partie les bactéries par des lavages et centrifugations successifs de leur substance agglutinante ; ce fait tendrait à démontrer que cette substance recouvre le microbe et se trouve à sa surface. D'autres faits concourent à permettre cette hypothèse émise d'abord par Nicolle et reprise par Malvoz.

Substance agglutinante microbienne

Nous venons de voir que la substance agglutinante contenue dans les microbes présentait à peu près les mêmes réactions physico-chimiques que l'agglutinine du sérum. Nous avons montré qu'on pouvait débarrasser du moins en partie les corps microbiens par des lavages successifs de cette substance de nature albuminoïde qui les entoure et les pénètre. On peut d'ailleurs se passer de moyens artificiels pour enlever aux microbes leur substance agglutinable ; elle diffuse d'elle-même dans les milieux liquides de culture; dans les cultures jeunes, elle est surtout dans le microbe ; chez les vieilles, elle est surtout dans le milieu.

Nous avons dit que cette substances microbienne correspondait à l'agglutinine du sérum spécifique, nous ajoutons que c'est elle qui détermine, dans le sang de l'animal injecté l'agglutinine qui lui correspond. Pas n'est

besoin en effet d'injecter les corps microbiens pour obtenir un sérum agglutinant; il suffit d'injecter le produit de leur lavage ou de leur macération; la preuve en est donnée par les propriétés agglutinogènes des autolysats injectés aux animaux et à l'homme. Dans ce cas, ce n'est pas un être vivant qu'on injecte, mais une substance chimique qui détermine dans le sérum des individus l'apparition d'une agglutinine, autre substance chimique analogue à la première.

Ce que nous venons de dire à propos de l'agglutination des microbes s'applique également aux agglutinations cellulaires. On obtient par les mêmes procédés l'agglutination des hématies avec des sérums hémolytiques obtenus par des injections de sang défibriné aux animaux (1).

Pour nous résumer, si on détruit dans une culture les microbes pour détruire la substance agglutinogène qu'ils contiennent, l'émulsion microbienne reste agglutinogène; si on enlève d'une culture les corps microbiens, par centrifugation, l'autolysat obtenu reste agglutinogène; si dans une culture ou dans un autolysat ou dans le sang défibriné, on détruit la substance capable de déterminer les agglutinines par un chauffage à 120° par exemple, le liquide obtenu n'est plus agglutinogène et le sérum spécifique n'agglutine plus les bactéries ou les globules correspondants.

(1) Dubois, en 1909, a démontré que si on injecte des hématies de poule à un lapin, on arrive à développer dans le sérum de ce dernier animal des propriétés hémolytiques et agglutinantes vis-à-vis des globules de la poule, mais si l'on chauffe à 115° les hématies avant de les injecter on ne développe plus qu'un taux infime d'agglutinines et pas d'hémolysines.

Si ces trois données expérimentales jettent quelque jour sur la nature des agglutinines et leurs propriétés, elles n'expliquent nullement le phénomène de l'agglutination en lui-même, phénomène physique d'après Gruber qui admettait que la couche superficielle des éléments microbiens se gonflait, devenait visqueuse et adhérente aux microbes voisins. Nicolle pense que la couche externe différente des microbes se coagule et contribue à réunir des éléments bactériens. Pour nous, nous pensons qu'il faut voir dans ce phénomène de l'agglutination un mécanisme analogue à celui qu'on observe dans la précipitation des colloïdes, de leurs solutions salines.

Origine des agglutinines.

L'origine des agglutinines est la même que celle des anticorps. En général, c'est dire qu'elle reste controversée, que les uns croient qu'elles viennent des leucocytes, les autres directement du sérum. Krauss et Schiffman pensent qu'elle se forme aux dépens de l'endothélium vasculaire et ne se répand dans les tissus ou les humeurs qu'à la faveur d'une lésion de cette membrane (1).

Signification des agglutinines.

Mais la question à laquelle s'attache à notre avis le plus grand intérêt, c'est de reconnaître exactement la

(1) Krauss et Schiffmann. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, p. 275.

signification de la présence des agglutinines dans un sérum.

Pfeiffer et Kolle, en 1896 (1), considéraient le phénomène de l'agglutination comme une véritable réaction d'immunité.

Le fait que les sérums spécifiques donnent le mieux la réaction constituait un sérieux argument pour cette hypothèse ; mais les recherches de Widal ont montré par la suite qu'il n'en était rien, que le phénomène était encore plus marqué pendant la période d'infection qu'après sa disparition ; qu'au moment où l'immunité était acquise et où l'organisme avait définitivement triomphé de la maladie, des agglutinines devenaient de moins en moins abondantes jusqu'à disparaître progressivement. Actuellement, chez les vaccinés contre les fièvres typhoïde et Para, on constate une agglutination nette pour les 3 bacilles T. A. B., mais si l'immunisé vient à être infecté par l'un quelconque de ces bacilles, le taux des agglutinines se rapportant à ce bacille augmente de façon considérable et un dosage comparatif avec les agglutinines correspondantes aux autres microbes du même groupe permet encore d'établir un séro-diagnostic et laisse toute sa valeur à la séro-réaction de Widal.

Les agglutinines et l'immunité.

L'agglutination n'est donc pas une réaction d'immunité, mais une réaction d'infection.

(1) Pfeiffer et Kolle. *Zeitsch. für Hygiene*, XXI, 1896, p. 203.

Nos expériences apportent encore à ce sujet des observations qui confirment cette donnée clinique.

C'est en réalité un signe de défense, un signe d'activité de l'organisme, signe qui fait défaut pendant la phase dite « négative » des vaccinés, période de quelques jours qui suit la première inoculation et pendant laquelle l'organisme n'a pas rassemblé ses moyens de défense.

Durant cette phase négative qui se manifeste aussi bien chez les infectés que chez les vaccinés, l'individu fixe ses corps microbiens, ses anticorps normaux, ses agglutinines générales non spécifiques; il n'a pas encore pu produire d'autres éléments de lutte.

D'après les auteurs, dans le cas de la vaccination antityphique; la date d'apparition des agglutinines varie avec les vaccins employés avec celui de Pfeiffer c'est le 7ᵉ jour qu'elles commencent à se montrer; avec celui de Wright, il faudrait attendre plus longtemps; avec celui de Vincent, elles se manifesteraient le 9ᵉ jour.

Quoi qu'il en soit, qu'on attribue aux agglutinines la valeur d'une réaction d'infection ou d'une réaction de défense, il n'en est pas moins vrai que leur recherche constitue chez un vacciné un moyen simple et rapide de constater si son sérum contient encore des anticorps et si son organisme est toujours en puissance d'immunité.

Nous nous sommes abstenu à dessein, dans cette rapide étude que nous venons de faire des agglutinines d'apporter les résultats de notre expérimentation et les conclusions que nous avons cru pouvoir énoncer relati-

vement à la signification des agglutinines chez les vaccinés et à la valeur de leur dosage relativement à l'appréciation d'un vaccin.

III. — Opsonines.

N'ayant pas particulièrement étudié les opsonines, nous n'insisterons pas sur la description de leurs caractères autant que nous l'avons fait pour les agglutinines.

Cette action stimulante des sérums spécifiques sur la phagocytose avait été remarquée depuis longtemps par Metchnikoff (1). C'est Wright et Douglas qui ont poussé le plus loin l'étude de la question.

Ils ont montré que les globules blancs sans sérum n'avaient qu'un faible pouvoir phagocyte ; entraînés dans leurs hypothèses, ils ont même un moment nié complètement ce pouvoir. Plus tard, ils ont établi que le sérum frais normal activait le pouvoir phagocytaire des globules blancs ; que le sérum des immunisés l'activait encore bien davantage.

Ces substances qui stimulent l'action des globules blancs ont reçu les noms successifs de stimulines et d'opsonines.

Propriétés des opsonines. — Le caractère spécifique des opsonines défendu par Douglas et Wright a été nié par de nombreux auteurs. Mihilt a cependant montré

(1) METCHNIKOFF. *L'immunité dans les maladies infectieuses*, 1907.

cette spécificité particulière en ce qui concerne le bacille typhique, mais ce dernier auteur ne leur attribue qu'une spécificité relative.

Les propriétés physico-chimiques de ces substances sont peu connues ; elles sont très fragiles, craignent la lumière, la chaleur à 60° et même à l'obscurité, elles se détruisent au bout de 5 à 6 jours.

On conçoit dans ces conditions qu'elles ne puissent présenter qu'un intérêt relatif, et qu'elles ont pu être non seulement fort controversées pour ce qui se rapporte à leur origine, mais que leur individualité même a souvent été mise en doute. Levaditi et Imman (1) ont montré qu'elles paraissaient dépendre de la teneur en alexine.

La méthode de Wright qui mesure l'indice opsonique des sérums et qui paraît avoir établi son droit de cité dans le domaine des recherches de laboratoire n'est pas exempte de toute critique. Le fait qu'on ne put trouver de globules blancs toujours semblables à eux-mêmes ne lui donne qu'une valeur relative et ne permet d'en tirer aucune conclusion absolue ; j'entends bien qu'on ne cherche qu'à établir une proportion entre les résultats obtenus avec le sérum à examiner et un sérum du témoin, mais ce sérum témoin constitue encore une inconnue dont on ne peut nier l'importance, puisque les sérums normaux sont plus ou moins opsonisants suivant leur teneur en alexine.

Et puis comment compter?... Faut-il faire état du

(1) Levaditi et Imman. *C. R. Soc. de Biologie*. 1907 (p. 68).

nombre de globules contenant des bacilles ou du nombre de bacilles contenus dans ces globules? Dans ces deux cas, dans l'une ou l'autre méthode, on se prive d'un élément d'appréciation important.

IV. — Précipitines.

Krauss en 1897 (1) a montré que l'organisme animal est susceptible de réagir contre l'introduction d'un élément étranger de nature azotée par la production de substances qui précipitent *in vitro* des solutions aqueuses de l'élément étranger constitué. Ces substances ont été nommées précipitines.

Leur nature est voisine de celle des agglutinines, leurs propriétés physico-chimiques sont à peu près les mêmes, leur spécificité n'est pas très prononcée, leur étude n'a pas été poussée aussi loin que celle des autres anticorps, on n'est pas plus fixé au sujet de leur origine qu'on ne l'est au sujet des agglutinines.

Krauss et Levaditi (2) ont montré qu'elles existaient dans les leucocytes ; pour Von Dungern (3), les éléments du sang participeraient à leur production ; pour Krauss et Schiffmann (4), ce serait l'endothélium vasculaire qui jouerait le principal rôle dans leur formation.

Leur étude n'a pas donné de résultats aussi intéres-

(1) Krauss. *Wienerklin. Wochensch.* n° 32 (1897).
(2) Krauss et Levaditi, *C. R. Ac. des sciences*, 1904.
(3) Von Dungern. *Die antikorper*, Iéna, G. Fisher, 1903.
(4) Krauss et Schiffmann. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, XX, p. 225.

sants aussi bien en ce qui concerne le diagnostic des infections, leur pronostic ou les recherches de laboratoire.

V. — **Bactériolysines.**

Dans l'exposé du phénomène de Pfeiffer *in vitro* ou dans l'épreuve du choléra-sérum nous avons vu que les bacilles, au contact du sérum des animaux vaccinés, subissaient une bactériolyse.

Ce pouvoir bactériolytique n'est pas une propriété exclusive des sérums immunisés : les animaux sains la présentent également par des germes variés mais, de même que pour les agglutinines, ce pouvoir lytique du sérum est beaucoup moins intense chez les individus sains que chez les vaccinés (Nuttal).

La vaccination n'a pas donné naissance à la substance bactériolytique ; elle l'a développée et orientée dans un sens, qui lui donne un caractère spécifique marqué.

De nombreuses recherches ont été faites sur la destruction *in vitro* des bactéries. Metchnikoff et ses élèves. Bordet, Nuttal ont apporté de précieux documents à cette étude.

Plusieurs théories ont été édifiées pour expliquer le phénomène de la bactériolyse et l'origine des substances bactéricides.

Nous n'exposerons pas ces diverses hypothèses qui ne trouvent pas leur place ici, mais qu'on accepte la vieille théorie humorale de Buchner et Flugg dont les adeptes se font de plus en plus rares ou qu'on se range

à celle de Metchnikoff qui attribue aux leucocytes le principal rôle, les faits demeurent.

Bordet a nettement montré que la bactériolyse *in vitro* se faisait par l'action simultanée de deux substances : la sensibilisatrice, substance spécifique particulière au sérum du vacciné, et l'alexine ou complément, substance non spécifique existant dans tous les sérums de la plupart des animaux.

La sensibilisatrice est thermo-stabile.

L'alexine est détruite par la chaleur à 55°. Il s'ensuit donc qu'on peut, facilement dans le sérum de l'animal vacciné séparer *in vitro* ces deux substances en détruisant la seconde.

Ainsi débarrassé d'alexine, l'immun-sérum est incapable de déterminer la bactériolyse des microbes *in vitro*, mais si on ajoute au mélange, bacilles et sensibilisatrice une alexine quelconque (sérum d'un animal neuf), l'alexine est immédiatement fixée et la bactériolyse commence.

C'est le phénomène de la fixation de l'alexine. Quand elle a pris sa place dans le trinôme : *bacille*, *sensibilisatrice*, *alexine*, cette dernière ne peut se déplacer et sortir de la combinaison pour se porter, même partiellement dans une autre qui pourrait éventuellement s'offrir à elle. C'est-à-dire que si dans un même tube où s'effectue la bactériolyse, on ajoute un autre système bactériolytique ou cytolytique, différent du premier, mais toujours dépourvu d'alexine, ce deuxième système ne pourra emprunter le complément qui lui est nécessaire à celui qui est entré dans la précédente combinaison et qui se

trouve de ce fait absolument inutilisable : entièrement fixé.

La destruction du microbe est donc le fait de l'union de deux substances, sensibilisatrice et alexine, dont la première seule est spécifique et engendrée par l'immunisation.

La sensibilisatrice est donc la véritable bactériolysine et sa puissance plus ou moins grande dénote une immunisation plus ou moins importante.

Doser les bactériolysines c'est, croyons-nous, doser l'immunité acquise par l'animal vacciné.

La présence de lysines spécifiques dans le sérum des typhiques a été établie par MM. Widal et Le Sourd.

Ces auteurs ont également démontré que les agglutinines ne présentaient pas les mêmes relations de présence ou d'absence que la sensibilisatrice spécifique. Ils ont trouvé des cas où le sérum possédait la sensibilisatrice et n'était pas agglutinant, et inversement.

Cela prouvait qu'il y avait dissociation entre ces deux phénomènes : « agglutination et bactériolyse ».

On conçoit tout l'intérêt qu'il y aurait à doser ces lysines spécifiques dans les sérums.

Le Sourd, dans sa thèse, a esquissé quelques essais de dosage quantitatif; il ne paraît pas qu'il soit arrivé à des résultats intéressants, probablement faute de méthode.

Wassermann et Kolle ont établi pour le sérum antiméningococcique un procédé de dosage des bactériolysines qui a été perfectionné par Nicolle, en 1918, et qui a servi à ce dernier auteur à apprécier la valeur théra-

peutique du sérum anti-méningococcique de l'Institut Pasteur, à titrer pour ainsi dire ces produits et à ne les déclarer proprement curatifs que s'ils présentent une quantité suffisante de lysines spécifiques.

Nous exposerons plus loin la méthode que nous avons suivie nous-même et les résultats qu'elle nous a donnés.

VI. — Des constatations expérimentales de l'immunisation chez les vaccinés.

La démonstration expérimentale de l'apparition de l'immunité chez l'homme vacciné est impossible; il faudrait pour la faire, lui injecter une dose microbienne dangereuse et prendre des individus témoins, encore que ce procédé ne soit pas exempt d'erreurs comme nous le verrons à propos de l'expérimentation animale. Il ne faut pas oublier en effet que le degré de l'immunité ne dépend pas seulement de la valeur bactéricide du sérum mais de la virulence des germes.

Lorsque tel animal vacciné a résisté à l'injection d'un nombre de bacilles alors que les témoins succombent en général en présence de la même quantité de germes, il faut pour être certain de son immunité savoir encore si les germes injectés aux témoins sont de la même souche que ceux qu'a reçus, l'animal vacciné, du même âge, de la même culture, sur le même milieu, prélevés dans les mêmes conditions.

Ce procédé uniquement expérimental, s'il permet de

constater l'immunisation, ne permet pas d'en évaluer la mesure.

Lorsque l'animal a résisté à une première injection d'un nombre n de bacilles virulents il est impossible de renouveler l'expérience avec un nombre plus élevé de bacilles : on ne se trouve plus alors dans les conditions normales.

Pour doser le degré d'immunisation, il faudrait en employant le procédé de l'inoculation secondaire de culture virulente injecter en série à des animaux des doses croissantes de culture ; on peut se rendre compte de la difficulté que présente une telle méthode et du nombre d'animaux qu'elle exigerait. Mais si l'on pousse plus loin la critique de ce procédé, il apparaît encore plus entaché d'erreurs, utilisé comme il l'a été par certains auteurs qui ont éprouvé l'immunité par ingestion de bacilles répandus sur les aliments, méthode essentiellement aveugle au point de vue quantitatif. D'autres ont injecté des bacilles à virulence exaltée, mais quels bacilles, avec quel excipient? Une culture en bouillon se comporte sur l'organisme animal tout à fait différemment que ne le fait une émulsion de bacilles dans l'eau physiologique; à côté de la virulence microbienne, il y a le pouvoir toxique du milieu qui entre en jeu et peut provoquer des phénomènes graves même en présence d'un animal immunisé contre la bactérie.

Il faut donc, à notre avis, chercher une autre méthode de mesure de l'immunité chez les animaux vaccinés.

L'immunisation se traduit dans l'organisme animal par la production d'anticorps que nous venons d'étudier ;

ces anticorps constituent les réactions de l'immunité. Doser ces anticorps, c'est évaluer en chiffres le degré d'immunisation obtenu. Mais tous les anticorps ne présentent pas la même valeur, ce sont surtout les bactériolysines qui offrent le plus grand intérêt.

Il faut, pensons-nous, doser le pouvoir bactéricide ou bactériolytique du sérum des vaccinés pour se rendre un compte exact de leur immunité. Ni le procédé, ni l'idée ne sont nouveaux. On procède ainsi à l'Institut Pasteur pour se rendre compte de la valeur curative des sérums équins livrés au commerce.

C'est ainsi avec des méthodes différentes qu'on dose *in vitro* le sérum antidiphtérique ou le sérum antiméningococcique.

Nous avons pour notre compte dosé les agglutinines sans préjuger de la valeur des renseignements que nous fournirait ce dosage. Nous avons dosé également les lysines par une méthode que nous exposerons plus loin.

Les chiffres fournis par ces deux dosages : agglutinines et lysines dans le sérum de nos animaux vaccinés constituaient pour nous de précieux résultats.

Nous complétions ces réponses par l'examen clinique de nos animaux et l'examen histologique des viscères après autopsie.

CHAPITRE II

PRINÇIPES ADOPTÉS POUR LA PRÉPARATION DES VACCINS

Choix du bacille.

Pour préparer nos vaccins bactériens, il nous fallut faire le choix d'un microbe; ce choix nous fut dicté par celui de l'animal qui devait servir dans nos expériences.

Ayant donné notre préférence au cobaye pour les raisons que nous exposerons plus loin, il fallait utiliser contre lui un bacille qui soit virulent. Nous avons pensé en effet, que nos expériences auraient eu moins d'intérêt, si pour préparer nos antigènes, nous avions fait usage d'un microbe incapable de se multiplier et d'envahir l'organisme de l'animal auquel nous l'injections.

On aurait pu observer que nos conditions d'expérience étaient très particulières et sans aucun rapport

avec ce qui se passe dans la pathologie humaine.

Ce reproche aurait été mal fondé, car le but que nous nous proposions étant de mesurer l'immunité *in vitro* chez les animaux vaccinés par des antigènes variés, il suffisait de pouvoir créer cette immunité ; pour la créer, il n'était pas besoin de s'adresser à un microbe virulent.

Quoi qu'il en soit, et pour donner plus d'intérêt à nos recherches, pour nous rapprocher le plus possible également de ce qui se passe en pathologie humaine, nous avons choisi, pour préparer nos antigènes, un microbe virulent pour le cobaye.

Les expériences de MM. Nicolle, Debains et Mlle Raphaël relatées dans leur quatrième Mémoire de 1918 établissent que des trois bacilles : Typhique, Para A et Para B, seul ce dernier est virulent pour le cobaye encore que toutes les races de Para B ne le sont-elles pas également.

Sur 25 échantillons examinés par les auteurs, 5 ont amené la mort en injection sous-cutanée en 3 à 10 jours.

Chez les animaux encore en vie au bout de 12 jours, ils ont constaté une bactériémie et des lésions viscérales importantes : rate hypertrophiée, bile purulente, abcès du foie, etc. Ces lésions montrent nettement le caractère pyogène, toxigène, et la virulence du Para B.

Etude de la légitimité du bacille choisi.

Les travaux de Nicolle, de Mlle Raphaël et Debains, ont montré également que, de tous les bacilles du groupe typhique, le Para B est le plus capricieux au point de vue de ses caractères antigènes.

Il est souvent à ce point de vue tout à fait anormal et comme il n'existe aucun rapport entre les caractères biologiques d'un microbe et ses caractères antigènes, il était absolument nécessaire après nous être assuré des premiers, de vérifier les seconds.

« On ne peut *partir*, dans une étude rigoureuse, que d'échantillons strictement légitimes, tout le reste étant basé sur cette légitimité des germes de référence ; on ne peut employer soit pour obtenir des sérums spécifiques, soit pour révéler la spécificité des sérums (séro-identification des microbes, séro-diagnostic des maladies) que des échantillons strictement légitimes au point de vue antigène, normaux ou non au point de vue biologique, peu importe » ainsi s'expriment fort justement les auteurs que nous avons cités plus haut.

Caractères biologiques.

Nous avions à notre disposition deux échantillons de bacilles paratyphiques B ; l'un d'eux possédait les réactions biologiques classiques, mais était anormal en ce sens qu'il ne produisait pas d'H^2S en milieu au sous-

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, n° 8, 1577, p. 408.

acétate de plomb liquide, quoiqu'il présentât une agglutination nette aux sérums spécifiques. Nous l'avons rejeté pour prendre le deuxième, qui était un échantillon strictement légitime au point de vue biologique.

Les *caractères généraux* de ce dernier sont conformes aux descriptions classiques des auteurs. A ces propriétés générales connues de tout le monde, nous devons ajouter quelques données particulières qui, si elles ne sont pas propres à notre échantillon, ont toujours été constatées avec lui. Nous avons éprouvé avec soin la résistance de notre paratyphique B à la chaleur.

Nous pouvons dire qu'une température de 55 degrés pendant 7 heures ne le tue pas: qu'une température de 57 degrés sérieusement contrôlée pendant 2 heures avec le thermomètre dans le tube d'émulsion ne le tue pas non plus; après 2 minutes à 80 degrés, les microbes restent mobiles l'ensemencement est positif. Par contre, 2 minutes à 90 degrés suffisent à le stériliser.

Le formol à 10 grammes pour 100 grammes d'émulsion n'arrive pas à la rendre immobile au bout d'une heure 1/2 contrairement à ce qu'on trouve mentionné dans tous les ouvrages, mais la stérilisation se produit malgré cela.

L'acide phénique à 1/2 p. 100 le stérilise.

L'éther en 35 minutes l'empêche de se développer.

La légitimité des caractères généraux ayant été établie, il nous restait à reconnaître la virulence de notre échantillon.

Etude de la virulence.

Nous avons ensemencé sur gélose, récolté au bout de 70 heures, les colonies dans du sérum physiologique ; nous avons établi la concentration en bacilles de l'émulsion obtenue par un procédé que nous décrirons tout à l'heure, et ceci étant fait, nous injections à des cobayes mâles de 500 à 700 grammes environ des doses décroissantes de bacilles.

Nous réalisâmes ainsi quelques expériences dont nous donnons ci-dessous les résultats.

Expérience n° 1. — Un premier cobaye mâle de 780 grammes a reçu 900 millions de bacilles vivants en injection sous-cutanée, ces bacilles se trouvaient en suspension dans deux centimètres cubes de sérum physiologique stérilisé ; l'injection a été faite sous la peau du dos.

L'animal est mort en 10 heures. A l'autopsie, nous n'avons macroscopiquement rien trouvé d'anormal dans les viscères qui paraissaient sains, mais la rate ensemencée a donné des bacilles Para B en abondance.

Expérience n° 2. — Le deuxième cobaye de 620 grammes a reçu 300 millions des mêmes bacilles, émulsionnés de la même façon dans la même quantité de sérum physiologique.

La mort de ce deuxième animal n'est survenue qu'au bout de 36 heures. Son autopsie nous a montré la présence d'une péri-hépatite exsudative et en partie adhé-

sive. Toute la surface supérieure du foie était couverte d'un enduit purulent pseudo-membraneux exsudatif. La bile ensemencée contenait des bacilles. Les intestins ne présentaient pas de lésions ni macroscopiques, ni microscopiques.

Ensemencée, la rate a donné une culture de bacilles Para B; elle n'était pas sensiblement hypertrophiée.

Expérience n° 3. — Nous avons préparé un autre animal avec 100 millions de bacilles et nous avons observé la mort en 3 jours avec les mêmes lésions que celles déjà mentionnées à propos de l'expérience n° 2.

Expérience n° 4. — Le quatrième cobaye a reçu seulement 40 millions de bacilles Para B émulsionnés de la même façon.

Les deux ou trois premiers jours, il a manifesté une anorexie marquée et une inertie partielle, mais le quatrième jour il mangeait normalement et donnait des signes visibles de santé.

L'animal tué au bout de 15 jours présentait de la préhépatite adhésive, une très grosse rate bourrée de bacilles avec périsplénite et foyers de nécrose microscopiques.

Les expériences qui précèdent, ont suffi à nous démontrer la virulence de notre bacille pour le cobaye; elles nous ont permis de plus, de déterminer à peu près à quelle dose limite nous obtenions la mort de nos animaux et quelle dose cessait d'être mortelle.

Cette dose non mortelle est de 40 millions de bacilles. Notre échantillon présente donc une virulence moyenne,

si nous en jugeons par les expériences de M. Besredka, qui étudiant diverses races de bacilles Para B, a obtenu la mort des cobayes avec des doses variant entre 1/100e et 1/8.000e de culture sur tubes de gélose suivant la race envisagée.

Ces chiffres ne représentent pour nous, comme nous le montrerons plus loin, aucune valeur fixe, puisqu'il est impossible de comparer entre eux au point de vue de l'abondance des germes, deux cultures sur gélose d'un même microbe, à plus forte raison deux cultures de microbes différents.

Mais quelle que soit la répulsion que nous ayons pour l'imprécision en matière scientifique qui résulte de l'emploi de termes non définis, nous pouvons cependant pour essayer une comparaison entre les chiffres de M. Besredka et les nôtres, dire que notre dose de 40 millions de bacilles correspondait dans notre cas avec notre échantillon de microbe et notre gélose à 1/200e de culture de 24 heures en tube d'abondance moyenne.

Ayant ainsi nettement établi le pouvoir pathogène et la virulence de notre bacille Para B, ayant également constaté à quelle dose il provoquait la mort, nous avions désormais à notre disposition un produit connu relativement dosé dans ses propriétés vis-à-vis du cobaye. Ajoutons que ce bacille Para B provenait de vieille souche ayant déjà servi à préparer pendant 3 ans des sérums antityphiques pour l'armée ; il offrait par conséquent, les plus grandes garanties de stabilité.

Nécessité de préparer les antigènes avec le même microbe et le même nombre de bacilles.

A condition de nous servir pour la préparation de nos antigènes toujours de la même race de bacilles, d'échantillon du même âge, poussés sur le même milieu de culture, nous avions, nous semble-t-il, le maximum de chances de garder entre les mains un instrument possédant des propriétés relativement constantes.

Mais il fallait non seulement avoir l'assurance d'opérer toujours avec un germe possédant des propriétés invariables, il fallait encore utiliser toujours la même quantité de microbes. Si sur tel cobaye nous injections aujourd'hui 100 millions de microbes chauffés à 60°, sur tel autre 10 millions chauffés à 100°, nous aurions été mal venu de chercher à établir des comparaisons entre les symptômes observés chez les deux animaux.

Les auteurs qui ont entrepris des expériences sur un sujet se rapprochant du nôtre, ne semblent pas avoir eu suffisamment ce souci de ne comparer entre eux que des effets produits par des causes comparables.

Dans leur ouvrage sur le lipo-vaccin, MM. Le Moignic et Césari insistent avec raison sur ce fait que « la quantité de bacilles est le premier des éléments d'où dépendent, d'une part l'efficacité d'un vaccin, d'autre part, son action toxique inopérant si la dose de bacilles est infime; ils peuvent être très dangereux, si celle-ci dépasse une certaine limite ».

Les auteurs qui se sont livrés à l'expérimentation sur les animaux, aussi bien dans la recherche de la virulence du Para B, que dans l'étude de la vaccination bactérienne, ne semblent pas au préalable, s'être souciés d'évaluer la quantité de bacilles injectés. Quand on lit sur un Mémoire qu'un animal a été injecté avec 1 centimètre cube d'une émulsion de bacilles provenant d'une culture sur gélose diluée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique, on doit s'estimer heureux d'avoir sur la valeur quantitative de l'antigène ces faibles éléments d'appréciation.

Or, des essais nombreux nous ont convaincu que des cultures sur gélose dans des tubes de verre de même dimension, ne pouvaient être comparées entre elles, au point de vue du nombre de bactéries qu'elles contenaient.

Nous avons acquis la conviction qu'en une ou deux heures d'étuve à 37°, le nombre de bactéries pouvait augmenter dans des proportions considérables.

La façon de pratiquer l'ensemencement en surface influe aussi pour une large part dans la quantité de microbes donnés par une culture.

De plus, tout le monde sait que des races de bacilles sont plus productives que d'autres, le Para B en particulier donne des cultures bien plus riches que le Para A et le typhique.

En dehors de toutes ces causes qui font varier la valeur quantitative d'une culture sur gélose, il en est vraisemblablement d'autres qui nous échappent et qui ont également leur importance.

Quoi qu'il en soit, il est un fait qui passe au-dessus de tous les raisonnements, c'est que nous avons trouvé dans des cultures d'un même microbe, sur une même gélose, du même âge, diluées dans 10 centimètres cubes de sérum physiologique des quantités de microbes variant entre 300 millions par centimètre cube et deux milliards. Dans ces conditions, on peut se demander quelle garantie présentent les études sur les réactions de plusieurs échantillons microbiens lorsque des doses injectées au cobaye sont établies en 1/100e, en 1/1.000^{e} de culture en gélose.

C'est donc se bercer d'une trompeuse illusion que de croire à la fixité quantitative de ce terme tel qu'il est employé par de nombreux auteurs : 1 centimètre cube d'émulsion de bacilles.

Pour obtenir des résultats comparables, il est nécessaire de partir de données comparables. Nous proposant de doser le pouvoir immunigène de vaccins résultant d'un traitement varié de bacille, il nous fallait éliminer deux causes d'erreur :

1° Celles qui pouvaient résulter du fait que nos microbes n'auraient pas été strictement semblables et auraient présenté des pouvoirs pathogènes différents;

2° Celles qui pouvaient résulter de cet autre écueil : l'inégalité des doses injectées.

En d'autres termes, dans l'étude du pouvoir immunigène d'un vaccin bactérien, on se trouve en présence de trois facteurs variables importants :

1° La virulence ou le pouvoir pathogène de l'échantillon microbien qui a servi à préparer le vaccin.

2° Le nombre de bacilles entrant dans la composition de la dose injectée.

3° Le traitement subi par les bacilles.

L'auteur qui voudra étudier les effets de la virulence des microbes dans le pouvoir immunigène des vaccins devra faire varier la virulence des germes en maintenant constants le nombre des bacilles injectés et le traitement subi par eux.

L'expérimentateur qui cherchera la dose microbienne optimum pour l'obtention de l'immunité, devra inoculer des quantités variables de bacilles en maintenant constants leur virulence et le traitement subi par eux.

Pour nous qui avons voulu étudier les effets produits par le traitement des bacilles sur leur pouvoir immunigène, il était nécessaire avant tout de nous assurer de la constance des deux autres facteurs qui entrent dans la préparation vaccinale, à savoir : la virulence des germes et le nombre de bacilles inoculés.

La constance de la virulence nous a paru suffisamment assuré par l'emploi dans nos vaccins d'un seul microbe : celui que nous avons soumis aux épreuves; par son emploi toujours dans les mêmes conditions de culture, avec les mêmes milieux, le même temps de germination. Notre échantillon étant déjà très vieux et servant à préparer des vaccins depuis fort longtemps pouvait être considéré comme stabilisé dans sa virulence.

Numération des bacilles.

Il fallait encore nous soumettre à l'obligation d'inoculer toujours la même quantité de bacilles.

Cette deuxième partie du problème ne fut pas la plus facile à résoudre et sa difficulté nous explique suffisamment pourquoi de nombreux auteurs ont préféré une solution qui leur donnait des garanties plus apparentes que réelles.

Dénombrer les bacilles contenus dans une émulsion microbienne, n'est pas chose extrêmement facile, et devient un travail fastidieux quand il s'agit de répéter l'opération avant chaque inoculation. Les auteurs qui ont entrepris cette tâche, qui fabriquant des vaccins ont voulu en établir scrupuleusement les doses en faisant la numération des germes, connaissent l'imperfection des techniques, et savent que parmi celles publiées il y a lieu de faire un choix judicieux.

Méthode de Nicolle, Mlle Raphael et M. Debains. — Dans leurs recherches sur l'agglutination de 5 échantillons de bacilles typhiques et paratyphiques, M. Nicolle, Mlle Raphaël et M. Debains ont eu recours pour obtenir une quantité d'antigène toujours égale à elle-même au procédé suivant :

Ensemencement dans des boîtes de Roux; après 24 heures à 37°, émulsion des microbes dans l'eau physiologique, mélange et turbinage électrique, centrifuge de Jouan. On traitait ensuite les culots par un grand

excès d'alcool éther (aa) et après dessication à 40° dans l'appareil à air chaud de Jouan, le culot de microbes secs était alors pesé et chaque lapin recevait ainsi 0 gr. 1 de germes séchés et détoxiqués. Un tel chiffre d'après la quantité de microbes qu'il comporte serait excessif pour des animaux de 0 kilogr. 500 si les auteurs n'avaient eu la précaution de faire subir à leurs germes des actions physiques et chimiques qui diminuent singulièrement leur pouvoir antigène; l'émulsion de 10 grammes de microbes dans un centimètre cube d'eau physiologiqne a été additionnée de 1 centimètre cube de pipéridine au 1/50e, et plongée 5 minutes dans l'eau bouillante.

La dessication que les microbes devaient subir d'après cette méthode précédée de l'action de l'alcool éther nous mettait dans l'impossibilité absolue d'y recourir. Il nous fallait rechercher un moyen de doser nos émulsions sans porter atteinte à la virulences des germes.

Méthode Le Moignic et Césari. — Dans leur travail sur le lipo-vaccin, MM. Le Moignic et Césari qui paraissent avoir attaché une importance particulière à la numération des germes, s'expriment ainsi :

« Dans l'état actuel de nos connaissances, on doit admettre que la dose de deux milliards de chaque microbe est nécessaire pour déterminer l'immunisation pendant une année au moins, à la condition que les procédés utilisés pour provoquer la mort des bacilles ne diminue pas trop leur pouvoir antigène ». Le vaccin fabriqué par ces auteurs à l'Institut Pasteur et livré aux

armées contient par centimètre cube 2 milliards 600 millions de bacilles typhiques et 12 milliards 275 millions de chacun des bacilles A, B.

Pour arriver à une telle approximation du nombre de microbes, les auteurs ont récolté dans du sérum physiologique les cultures sur gélose ; ils centrifugent l'émulsion à 5.000 tours pendant 20′, décantent le plus près possible du culot, recentrifugent pendant 10′, et recueillent les dernières gouttes de liquide ; la masse microbienne humide qui reste au fond du tube est évaluée en poids par différence entre le poids du tube qui la contient et celui du tube vide pesé avant la centrifugation. Des numérations répétées ont montré aux auteurs qu'obtenue dans ces conditions, la masse pâteuse formant culot contenait 1.300 millions de microbes par milligramme. La pesée ainsi décrite par M. Césari est une méthode qui paraît exacte pour évaluer une quantité appréciable d'antigène. Nous avons pensé un moment pouvoir l'adopter et nous reporter aux chiffres donnés par MM. Le Moignic et Césari, mais quelques expériences de contrôle nous ont montré la nécessité de refaire nous-même la numération de nos émulsions par une méthode plus précise, permettant d'évaluer des doses plus petites que celles qu'on évalue ordinairement par pesées.

Méthode adoptée. — Ne pouvant utiliser la méthode de MM. Le Moignic et Césari pour les raisons que nous avons indiquées, nous trouvant également dans l'impossibilité de nous servir des procédés de dosage de

MM. Nicolle, Mlle Raphaël et Debains, puisque ce procédé comporte à sa base une altération profonde des bacilles, nous avons essayé la plupart de celles publiées par les auteurs.

La méthode réfractométrique ne nous a pas paru *a priori* donner des garanties suffisantes, l'opacité d'une émulsion tenant autant à la présence de colloïdes qu'à celle des microbes ;

La numération en plaque de gélatine nous donnait un résultat trop tardif, à un moment où nos émulsions vivantes pouvaient déjà avoir évolué dans un sens ou dans un autre et elle ne pouvait de plus s'appliquer aux émulsions de bacilles morts.

Celle de Wright qui est basée sur la numération comparée avec des hématies, nous a donné des mécomptes sérieux ; nous les attribuons à ce qu'elle comporte en elle-même plusieurs causes d'erreurs. Il faut faire d'abord une numération d'hématies, ensuite un mélange intime d'émulsion bacillaire et de sang ; en troisième lieu, une proportion entre bacilles et globules rouges.

Dans les trois temps de cette méthode : numération des hématies, mélange intime des hématies et des globules, calcul proportionnel des deux catégories d'éléments, on peut commettre des erreurs qui, s'ajoutant ou se multipliant, donnent souvent un résultat assez éloigné de l'exactitude.

Il nous a paru plus simple de supprimer les deux derniers temps de la méthode et de modifier le premier de telle façon qu'au lieu de consister dans une numé-

ration d'hématies, il consiste tout uniment dans une numération bacillaire directe. C'est la méthode qui nous est apparue la plus précise, à condition de procéder comme nous allons l'indiquer :

Avec une pipette effilée, nous prélevions 9 gouttes de la solution suivante, que nous placions dans un verre de montre.

Bleu de méthylène 1/100	4 cm^3
Formol	10 —
Sérum physiologique	4 —

Avec la même pipette lavée au sérum physiologique stérilisée et séchée, nous prélevions I goutte d'émulsion bactérienne que nous laissions également tomber dans le verre de montre.

Pour le prélèvement de ces gouttes, nous avions soin de maintenir la pipette au même degré d'inclinaison de façon à avoir des gouttes égales.

Avec le fil de platine, nous portions sur une cellule graduée de Thoma une goutte de l'émulsion colorée contenue dans le verre de montre après l'avoir agitée longuement pour en favoriser l'homogénéisation.

Notre cellule recouverte d'une lamelle était portée sur la platine du microscope.

Si on essaie de pratiquer de suite le dénombrement microbien, on s'expose à de sérieuses erreurs. L'expérience nous a montré qu'il fallait attendre une heure environ pour assurer l'immobilité partielle des microbes, leur coloration et leur chute autant que possible sur le fond de la cellule.

Après cette période de repos indispensable, nous faisions notre examen avec un objectif sec n° 7, un oculaire fort 3 ou 4; le grossissement ainsi obtenu était suffisant pour nous permettre de faire une observation nette des bacilles, la distance frontale de l'objectif était suffisante pour que la lentille du système optique ne touche pas la lamelle couvre-objet.

Pour une observation nette du réticulum et des bactéries, il ne faut pas trop de lumière et cette particularité permet d'employer des oculaires forts, généralement peu lumineux; de plus, il est nécessaire d'examiner plan par plan en faisant varier la vis micrométrique extrêmement lentement et en utilisant à chaque moment toutes les ressources d'éclairage et les jeux de diaphragme du microscope.

On nous pardonnera le long exposé de ces conseils, qu'on n'a pas besoin d'indiquer à un bactériologiste rompu à la pratique du microscope, mais qu'il est nécessaire de connaître quand on essaie pour la première fois cette technique.

Nous pouvons dire qu'avec toutes ces précautions, les résultats que nous avons obtenus et contrôlés un nombre important de fois nous ont offert le maximum d'exactitude qu'on est en droit de demander.

Ainsi chaque émulsion était au préalable titrée quantitativement avant de subir n'importe quelle préparation. On ne s'étonnera donc pas de ne pas trouver au cours de nos expériences les termes habituellement employés par les auteurs de 1/10e à 1/20e, etc., de culture sur gélose, de milligrammes de microbes, d'öse

ou d'anses, etc., mais de leur voir substituer des termes plus exacts puisqu'ils représentent le nombre même des bacilles injectés.

De l'impossibilité de partir d'émulsions mères. — La technique que nous venons de décrire comportait le minimum d'erreur possible dans la numération des bactéries, mais on ne peut se dissimuler qu'elle représente une tâche pénible et dénuée d'intérêt. Nous nous sommes demandé si nous ne pourrions pas pour préparer nos antigènes partir d'une émulsion mère exactement titrée et d'en pratiquer des dilutions au fur et à mesure de nos besoins.

Nous fîmes quelques expériences à ce sujet pour nous rendre compte si une émulsion mère donnée pouvait en quelques jours changer de valeur toxique.

Nous avons constaté d'abord qu'une même émulsion de bacilles vivants, centrifugée à 24 heures d'intervalle au même nombre de tours (6.000) et le même temps (3 minutes), donne un culot plus important quand elle est plus vieille de 24 heures. Nous pensons que ce culot est augmenté par des bacilles morts.

Nous avons fait deux émulsions de 30 millions de bacilles chacune, nous avons injecté la première à un cobaye qui a survécu; nous avons laissé vieillir 48 heures l'autre émulsion de 30 millions de bacilles, nous l'avons injectée à un deuxième cobaye qui a succombé au bout de 28 heures avec des lésions constituées par une congestion intense des organes intestinaux, du foie, en particulier, qui était entouré d'un exsudat bourré de bacilles. La rate contenait également des bacilles.

A quoi attribuer cette toxicité particulièrement exaltée de la deuxième émulsion qui ne se différenciait de la première qu'en ce qu'elle était de 48 heures plus vieille?

Nous eûmes l'idée de refaire la numération de cette deuxième suspension microbienne, et nous pûmes nous rendre compte qu'au lieu de contenir 30 millions de bacilles comme nous l'avions constaté, deux jours auparavant, elle en comptait 180 millions.

Ce fait seul suffisait à nous expliquer la mort si rapide de notre deuxième animal. Il est possible néanmoins qu'à côté de ce facteur du nombre intervienne un autre facteur d'hypertoxicité causé par les microbes morts plus toxiques que les éléments vivants, comme nous l'avons montré dans une communication récente à la Société de Biologie.

Nous pouvions donc conclure qu'une émulsion de bacilles vivants dans l'eau physiologique stérilisée continuait au moins pendant les premiers jours, même exposée à la lumière diffuse du jour et à une température ne dépassant pas 15° à s'enrichir en bacilles par multiplication de ces derniers.

Nous fîmes d'ailleurs dans la suite de nouvelles expériences à ce sujet et nous observâmes en effet, que les émulsions de bacilles vivants dans l'eau physiologique se concentraient en corps microbiens avec le temps et même dans des conditions physiques défavorables. La simple comparaison macroscopique d'un tube d'émulsion après 3 jours de préparation et d'une émulsion témoin de bacilles tués montre à première vue l'opacité plus grande de la première due à la multipli-

cation de microbes en suspension et à l'augmentation du nombre de bacilles morts.

Le fait avait d'ailleurs été signalé par Strauss et Dubary qui ont observé cette multiplication non dans le sérum physiologique, mais dans l'eau stérilisée de l'Ourcq (1), dans les mêmes conditions de température et de lumière que celles où nous nous trouvions.

Dès ce moment, nous étions convaincu de la nécessité absolue de faire la numération exacte des bactéries contenues dans nos antigènes immédiatement avant leur inoculation en ce qui concerne les bacilles vivants, et après leur mort quand nous opérions sur des bacilles tués.

En résumé, pour préparer nos vaccins, nous sommes parti des principes suivants :

1° Utiliser un bacille virulent pour le cobaye.

2° Employer toujours le même échantillon de bacilles cultivé sur le même milieu pendant le même temps : en l'espèce, culture sur gélose de 20 heures et émulsion dans le sérum physiologique stérilisé.

3° Quelles que soient les préparations subies par les bacilles, qu'ils soient vivants ou morts, injecter toujours le même nombre de corps bacillaires : en l'espèce 40 millions de microbes exactement numérés.

Ayant ainsi fixé le plus possible tous les termes qui pouvaient varier à notre insu, nous pouvions à notre gré faire subir aux microbes les variations de préparations que nous jugions nécessaires et étudier l'effet produit par elles sur l'animal.

(1) Strauss et Dubary. *Arch. de Méd. expérimentale.* I, 1889.

CHAPITRE III

MÉTHODE DE VACCINATION ADOPTÉE

Choix des animaux.

Les expérimentateurs qui ont étudié les sérums spécifiques donnés par des bacilles typhiques ou paratyphiques ont pour la plupart choisi le lapin comme animal d'expérience.

Cet animal serait le plus agglutinopoïétique et antipoïétique en général. En dehors de ces caractères physiologiques, il présente des caractères morphologiques qui ont leur intérêt. On peut facilement lui retirer du sang par la veine marginale de l'oreille, on peut facilement lui faire des injections intra-veineuses par la même voie.

Toutes ces raisons ne nous ont pas décidé à adopter cet animal. Sans doute il donne des taux d'agglutinines que l'on ne peut guère atteindre que chez le cheval, mais ces agglutinines disparaissent rapidement. Les facilités qu'il nous offrait avec l'accessibilité de ses veines

avaient peu d'intérêt pour nous qui avions résolu d'utiliser uniquement la voie sous-cutanée dans le but de nous rapprocher le plus possible de ce qui se passe chez l'homme vacciné.

En utilisant le cobaye, nous avions de sérieux avantages. D'abord celui de posséder dans le groupe des bacilles typhiques un microbe virulent pour lui, ensuite d'être plus certain de trouver des individus semblables entre eux. Chacun sait que le cobaye est l'animal qui présente suivant les individus le moins de caractères différentiels.

Dans l'évaluation de la dose d'antigène à injecter, nous n'avons pas cru devoir tenir compte du poids de l'animal et ainsi faire varier ces doses d'après ce poids, en inoculant par exemple une quantité *n* de microbe par 100 grammes de cobaye. Etant donné que dans la vaccination humaine on n'est pas habitué à une telle manière d'opérer, nous nous sommes abstenu d'y avoir recours.

Nous avons pris autant que possible des cobayes mâles ou des femelles non pleines.

Les animaux présentaient tous un poids variant entre 500 et 700 grammes, étaient de constitution robuste et saine.

Procédé d'inoculation.

Nous avons inoculé nos animaux au moyen d'injections sous-cutanées pratiquées au niveau de la région dorso-

lombaire du cobaye avec les précautions aseptiques d'usage.

Au bout de 18 jours, nous les avons sacrifiés : leur poids contrôlé au moment de l'autopsie a pu être comparé avec celui qu'ils accusaient au moment de l'inoculation.

Les viscères ont été examinés histologiquement ; le foie et la rate surtout ont pu nous donner des renseignements intéressants. Quant au sang, il fut prélevé par saignée et fit l'objet d'études spéciales.

Nous nous sommes demandé si une telle méthode, consistant à ne pratiquer sur le même animal qu'une seule injection de vaccin était susceptible de nous donner d'excellents résultats. Etant donné que nous étions parti d'une dose d'antigène représentée par 40 millions de bacilles, que dans la vaccination humaine on emploie en totalité environ 5 milliards de bacilles et qu'un cobaye en poids peut être évalué à environ la centième du poids d'un homme, nous nous trouvions de ce fait avoir en une seule fois injecté au cobaye la dose de bacilles qui convenait, comparée à la dose vaccinante humaine.

Si nous avions répété cette injection, nous aurions sans doute obtenu des taux d'agglutinines et de lysines plus élevés mais dont la lecture n'aurait rien ajouté à l'éloquence des comparaisons à établir entre les réactions propres à chaque antigène.

Des divers vaccins que nous avons préparés et expérimentés.

Nous aurions voulu préparer et inoculer tous les vaccins connus, nous nous sommes livré dans ce but à une petite étude historique de la vaccination antityphique et nous sommes rapidement arrivé à nous convaincre que l'ampleur de la besogne dépassait nos moyens.

En 1905, Paladino Blandini dénombrant les vaccins employés par les auteurs, en compte 17. Il est inutile de dire que ce nombre s'est actuellement considérablement accru, mais il est juste d'ajouter cependant que beaucoup de préparations ne diffèrent que par des points de détails qui ne paraissent *à priori* avoir d'importance qu'aux yeux des auteurs qui les ont imaginées.

On peut se demander en effet si pour achever la stérilisation de microbes déjà tués par la chaleur, il y avait grand avantage à substituer le tricrésol au crésol.

Ce qui nous obligea à limiter le nombre de nos préparations bactériennes est moins la multiplicité des procédés employés que la complexité de certains d'entre eux.

Nous n'avons pas pu préparer en particulier les autolysats car quel que fut le procédé employé, nous ne serions pas parvenu à établir entre ces antigènes et les autres une commune mesure, et nos résultats n'auraient pu être comparés.

Le lipo-vaccin largement employé par les armées

alliées préparé à l'Institut Pasteur par MM. Le Moignic et Césari nous aurait vivement intéressé, mais la technique de sa préparation ne se prête pas à une évaluation quantitative aussi précise que celle que nous demandions. Les auteurs précédents ont bien voulu mettre à notre disposition des tubes contenant 3 milliards de bacilles par centimètre cube, mais comme nous n'opérions qu'avec des quantités correspondantes à 40 millions de microbes, il nous fallait diviser le centimètre cube en 7,5 parties ; si l'on songe que ces préparations huileuses sont loin d'être homogènes, on conçoit les chances d'erreur qui se seraient offertes à nous.

Nous diviserons les vaccins utilisés par nous en trois catégories suivant que les bactéries ont été soumises à l'action de la chaleur, des agents chimiques, ou employées vivantes.

Nous rappelons que toutes les préparations indiquées ci-dessous ont été dénombrées à 40 millions de microbes.

Vaccins avec bacilles chauffés.

N° 1. — Bacilles chauffés à 56° pendant 2 heures ; c'est le vaccin de M. Widal. Nous avons pu constater que cette préparation quoique chauffée à 56° pendant 2 heures n'était pas stérile, qu'elle pouvait pousser sur gélose et que les bactéries étaient toujours mobiles.

N° 2. — Bacilles chauffés à 80° pendant 2 minutes. La préparation n'était pas stérile complètement ; ensemencée, elle nous a donné de rares colonies bien moins abondantes que celles obtenues avec les bacilles chauffés

à 56°. Elle n'a pas été employée dans la vaccination humaine.

N° 3. — Bacilles chauffés à 90° pendant 2 minutes; préparation toujours stérile, non utilisée dans la vaccination humaine.

N° 4. — Bacilles chauffés au bain-marie pendant 8 minutes. Nous avons voulu ainsi obtenir une forte désagrégation bactérienne.

N° 5. — Bacilles poussés en bouillon Martin, dénombrés à 40 millions et chauffés à 53° pendant 1 heure, additionnés de 25 p. 100 de lysol ; c'est le vaccin de Wright, modifié par Leishman. L'épreuve de stérilité faite a montré que les bacilles étaient tués.

N° 6. — Bacilles chauffés à 56° pendant 1 heure en émulsion dans ce sérum physiologique additionné de 2 gr. 5 de crésol par 100 grammes. C'est le vaccin de Chantemesse; préparation stérile.

N° 7. — Bacilles chauffés à 60° pendant 2 heures additionnés de 2 gr. 50 p. 100 d'acide phénique et chauffés de nouveau à 60°, 1/2 heure : c'est le vaccin de Pfeiffer et Kolle ; préparation stérile.

Vaccins avec bacilles vivants.

N° 8. — Préparation avec 40 millions de bacilles vivants émulsionnés dans le sérum physiologique et provenant de cultures sur gélose de 20 heures.

N° 9. — Préparation de Nicolle, Conor et Conseil. Les microbes sont lavés plusieurs fois à l'eau salée par centri-

fugations successives. Une dernière centrifugation partielle précipite au fond des tubes la plupart des corps morts ; il ne reste en suspension que les bacilles bien vivants. On pratique une numération de ces derniers éléments et on injecte la préparation de 40 millions de ces bacilles.

N° 10. — Vaccin de Besredka; après numération, on agglutine les bacilles en suspension dans le sérum physiologique par un sérum spécifique, on lave ensuite les bacilles pour les débarrasser de l'excès de sérum agglutinant.

Vaccins avec bacilles stérilisés par les agents chimiques.

N° 11. — Une émulsion de bacilles vivants et stérilisés par l'acide phénique à 1/2 p. 100 : c'est la préparation préconisée par Semple et Matson.

N° 12. — Une émulsion de bactéries dans l'eau physiologique est additionnée d'éther et agitée après 5 heures de contact; on fait évaporer à 37° l'excès d'éther et on injecte la préparation ; la stérilisation est effective après 35 minutes de contact. Cette affirmation du Professeur Vincent a été contrôlée et vérifiée par nous.

CHAPITRE IV

PROCÉDÉS EMPLOYÉS POUR LE DOSAGE DES AGGLUTININES ET DES BACTÉRIOLYSINES.

Avant de donner les résultats de nos expériences avec les vaccins dont nous venons d'indiquer les diverses préparations, il nous semble nécessaire d'exposer les procédés que nous avons employés pour doser, dans le sérum de nos animaux, les agglutinines et les lysines, puisque ce sont ces deux substances qui ont particulièrement fait l'objet de nos études.

DOSAGE DES AGGLUTININES

Pour doser les agglutinines contenues dans le sérum de chaque animal, nous avons employé la méthode suivante :

Une émulsion type de bacilles vivants contenant 200 millions de germes par centimètre cube était répartie

en tubes, de 10/100 à raison de 1 centimètre cube par tube.

Cette émulsion provenait d'une culture sur gélose de 24 heures en boîte de Roux ; les bacilles étaient en suspension dans le sérum physiologique.

Pour chaque dosage, nous disposions d'environ 12 tubes contenant 1 centimètre cube d'émulsion et nous ajoutions à chacun d'eux respectivement : 1/20e, 1/40e, 1/125e, 1/250e, 1/300e, 1/400e, 1/500e, 1/1000e, 1/1500e, 1/2000e, 1/3000e, 1/4000e de centimètre cube de sérum à examiner.

La lecture des résultats se faisait au bout de 24 heures de séjour à la température du laboratoire.

Dans cette lecture, nous tenions compte d'une agglutination *même partielle* que nous pouvions apprécier à la loupe en comparant avec de nombreux tubes témoins d'émulsion seule.

Il y a lieu de bien tenir compte de cette remarque pour la critique de nos résultats, car les chiffres donnés par nous pourraient sans cela paraître fort exagérés à ceux qui ont l'habitude des dosages de ce genre et qui savent que le cobaye n'est pas un animal très agglutinopoïétique.

Nous n'avons pas cru devoir nous astreindre à ne tenir compte que d'une agglutination totale, les chiffres observés dans ce cas n'auraient pas présenté entre eux une échelle de variation suffisamment grande pour nous permettre de les comparer entre eux et d'apprécier des différences. Dans plusieurs sérums en effet qui donnaient une agglutination partielle de 1/250e ou 1/300e, on n'observait pas d'agglutination totale.

Nous avons pu encore constater des résultats paradoxaux et observer ainsi des sérums ne donnant pas d'agglutination ou une agglutination partielle à 1/10e et une agglutination totale à 1/500e.

Ce phénomène intéressant, observé également par Césari, a été décrit par Weissenbach et Gautier (1), sous le nom de phase négative du phénomène d'agglutination.

Nous avons adopté la méthode précédente à l'exclusion de toute autre. Nous avions besoin de déterminer les chiffres limites d'une agglutination très poussée. Nos sérums étaient en général peu riches en agglutinines, nous ne pouvions utiliser la méthode macroscopique rapide à la loupe, extrêmement pratique pour les sérums fortement agglutinants, ni la méthode microscopique moins précise quantitativement.

Nous n'avons pas utilisé une émulsion de microbes morts pour être plus certain de la constance de nos résultats. Les microbes morts agglutinent comme nous l'avons vu, mais agglutinent d'autant moins facilement qu'ils ont été chauffés plus fortement. On peut supposer dans le même ordre d'idée et d'une façon plus générale, que leur propriété de s'agglutiner en présence de sérums spécifiques varie avec l'importance de l'action stérilisante qu'ils ont subie. Dans ces conditions, nous étions exposé en ayant recours à des émulsions stériles à ne pas posséder pour chaque expérience des suspensions équivalentes quant à leur pouvoir agglutinant.

(1) Gautier (Thèse Paris, 1917).

Dosage des bactériolysines.

Le sérum des vaccinés est bactéricide. Pour apprécier ce pouvoir bactéricide, nous avions à notre disposition le procédé qui consiste à faire agir *in vitro* le sérum sur des germes correspondants et de faire des numérations en boîte de Pétri; on compte les survivants et on apprécie comparativement avec un sérum sain.

Nous avons rejeté d'emblée ce procédé, qui ne nous a pas paru offrir des garanties suffisantes. *A priori*, on conçoit que la quantité de microbes survivant à l'action bactéricide dépend de la résistance de ces propres germes et de l'action lytique du sérum ; l'évaluation du pouvoir bactéricide dépend donc en grande partie de la qualité des germes soumis à son action et ce facteur représente une inconnue du problème qui apporte dans la réponse, quelle qu'elle soit, un caractère de relativité qui lui enlève une grande partie de son intérêt. Dire que tel sérum a un pouvoir bactéricide élevé, c'est évaluer une inconnue au moyen d'une autre inconnue.

Il existe un autre procédé pour évaluer le pouvoir bactériolytique des sérums ; ce procédé employé par Kolle et Wassermann, puis par Nicolle dans l'appréciation des sérums antiméningococciques de l'Institut Pasteur consiste à doser la sensibilisatrice spécifique au moyen de la réaction de Bordet et Gengou.

Comme nous l'avons vu dans un précédent chapitre, c'est la sensibilisatrice qui dans un sérum spécifique joue le rôle de bactériolysine en s'unissant au complé-

ment mis en présence de l'antigène correspondant; elle s'empare de l'alexine qui peut se trouver mélangé *in vitro* avec elle, la fixe, formant ainsi une sorte de combinaison indissoluble.

C'est sur la présence de cette sensibilisatrice spécifique et sur sa propriété de fixer le complément qu'est basée comme on le sait la réaction de Wassermann.

Widal et Le Sourd ont mis en évidence dans le sérum de malades atteints de fièvre typhoïde la sensibilisatrice typhique par le même procédé de Bordet et Gengou.

Ils ont même essayé de doser cette substance et de transformer ainsi la réaction qualitative en un procédé quantitatif; leurs essais ne paraissent pas avoir été très concluants en ce qui concerne la mesure de cette sensibilisatrice.

De notre côté, en nous inspirant du procédé de Kolle et Wassermann et de Nicolle appliqué aux sérums antiméningococciques, nous avons pu mesurer cette sensibilisatrice qui représente réellement le pouvoir bactériolytique du sérum.

Ce pouvoir bactériolytique ainsi évalué peut-il être considéré comme plus constant que le pouvoir bactéricide évalué par l'action directe sur les germes. *A priori*, il est possible de répondre par l'affirmative. La réaction se passe en présence de trois substances : le complément qu'on peut admettre comme représentant un terme fixe, dosable et connu (sérum frais de cobaye), la sensibilisatrice qui est l'inconnu à déterminer et l'antigène.

De la fixité de ce dernier terme dépend l'invariabilité des résultats obtenus.

L'antigène est préparé avec une émulsion dans le sérum physiologique de bacilles paratyphiques B tués par la chaleur à 100° pendant 10'. Une telle préparation ne présente rien de semblable à l'émulsion de bacilles vivants où les germes luttent contre l'action bactéricide d'un sérum. L'antigène se rapproche plus d'une composition chimique que d'une émulsion bactérienne. On peut croire dans ces conditions que dans un antigène la virulence ou la résistance de la race microbienne présente moins d'importance que lorsqu'il s'agit d'évaluer le pouvoir bactéricide d'un sérum.

En résumé, quelle que soit la race de bacilles employés pour préparer un antigène à microbes tués, la préparation apparaît plus stable et plus fixe biologiquement qu'une émulsion de bacilles vivants.

La réaction de Bordet et de Gengou quantitativement est donc susceptible de donner dans ces conditions des résultats beaucoup plus comparables entre eux que ne le sont les évaluations du pouvoir bactéricide.

Qu'on nous permette d'exposer brièvement cette méthode.

On peut disposer d'environ 10 tubes de 10 × 100 millimètres par sérum à examiner. Il faut ajouter à ces « *tubes réaction* » autant de « *tubes témoins* ».

Dans chaque tube, on verse un centimètre cube d'antigène. Cet antigène dont nous avons indiqué précédemment la préparation doit être convenablement dilué. Nous avons vu que dans sa thèse M. Le Sourd préconise un antigène assez concentré en bacilles et tel qu'il apparaisse dans le tube assez louche. Nous croyons

qu'une telle préparation doit être très diluée; elle ne permet pas de doser des petites quantités de sensibilisatrice, elle fixe par elle-même une grande quantité de complément et nous a donné de ce fait au début de nos recherches des résultats décevants.

Nous avons reconnu la nécessité de recourir à un antigène très peu concentré en microbes, n'en contenant pas plus de 40 millions par centimètre cube, comme nos préparations vaccinales. Ces indications ne dispensent d'ailleurs pas de doser l'antigène par les procédés connus.

Après avoir introduit 1 centimètre cube d'antigène dans les dix tubes R et les 10 tubes T, on ajoute dans les premiers des quantités de sérum à examiner correspondant à :

1.	1/20	de cm^3 dans le	premier	tube R
2.	1/40	—	deuxième	tube R
3.	1/125	—	troisième	—
4.	1/250	—	quatrième	—
5.	1/500	—	cinquième	—
6.	1/750	—	sixième	—
7.	1/1.000	—	septième	—
8.	1/1.500	—	huitième	—
9.	1/2.000	—	neuvième	—
10.	1/3.000	—	dixième	—

Le sérum à examiner doit être autant que possible recueilli aseptiquement; sinon il doit être conservé frais.

Un sérum septique au sein duquel végèterait une flore bactérienne importante deviendrait impropre à la recher-

che des lysines; il se trouverait même capable de fixer seul une grande partie de complément.

Les 10 tubes témoins sont préparés de la même façon que les tubes réaction, mais le sérum à examiner est remplacé par un sérum de cobaye normal tué le même jour que le cobaye vacciné. Cette précaution est indispensable pour que le complément de l'un soit identique au complément de l'autre (cette substance perdant progressivement de sa valeur alexique en vieillissant (1).

On ajoute ensuite aux 20 tubes indistinctement 1/20e de centimètre cube de sérum frais de cobaye.

Après avoir mélangé, on place à l'étuve à 37° pendant 2 heures. Au bout de ce temps, on ajoute à chaque tube le système hémolytique connu :

Sérum antimouton : 1/20 de centimètre cube.

Globules de mouton lavés : 1/10 de centimètre cube.

Ces doses aussi bien que celles du sérum frais de cobaye ne sont données qu'à titre d'indication approximative mais on ne peut se dispenser en aucun cas de les vérifier par des dosages préalables.

On replace enfin les tubes à l'étuve après avoir effectué soigneusement le mélange et on suit l'hémolyse. On lit les résultats en comparant avec les témoins.

Dans la lecture de ces résultats, nous n'avons pas cru devoir nous arrêter au dernier tube non hémolysé et établir par la quantité de sérum introduit dans ce tube, le taux des lysines correspondantes; nous aurions obtenu

(1) Mme Toitot-Brenet, dans sa thèse (1919), a montré que le 3e jour la valeur complémentaire du sérum de cobaye était 75 p. 100 de ce qu'elle était au 1er jour et que les jours suivants, cette valeur diminuait plus rapidement encore pour tomber à zéro au bout de 15 jours.

par ce procédé des chiffres bien inférieurs à ceux que nous publions, des chiffres qui n'auraient présenté entre eux que des écarts insignifiants ou pas d'écart du tout.

Voici comment se passe la réaction : Le tube témoin n° 1 ne contient pas de sensibilisatrice, par conséquent tout le complément qu'il contient reste libre pour le système hémolytique secondaire; il contient la même dose d'alexine que les autres tubes; il contient encore en plus 1/20e de centimètre cube du complément atténué disponible dans le sérum témoin normal. C'est ce tube qui s'hémolyse le premier; les autres suivent.

Si l'on considère les tubes R, il se passe le phénomène inverse et l'hémolyse commence par le dernier tube; qu'on lise les résultats à un moment donné quelconque, en comparant les tubes témoins aux tubes réaction correspondants, on arrive à observer dans un tube témoin donné une hémolyse égale (partielle ou totale) à celle qu'on peut voir dans le tube R. qui lui correspond. On note le tube qui précède immédiatement celui-ci, et la fraction de centimètre cube de sérum introduite dans ce dernier, représente le taux des lysines contenues dans le sérum.

Ainsi pour prendre un exemple; supposons que les tubes 8, 9, 10 R. sont hémolysés au même degré que les tubes 8, 9, 10 T.

Le 7 R. présente une hémolyse moins complète que le 7 T. : Ce tube contient 1/1000e de centimètre cube de sérum à examiner, nous dirons que ce sérum présente un pouvoir lytique de 1/1000e.

CHAPITRE V

RÉSULTATS OBTENUS

Connaissant notre méthode d'expérimentation, il nous reste maintenant à exposer les résultats obtenus.

Vaccins avec bacilles vivants.

Expérience n° 1.

Cobaye n° 3 de 590 grammes injecté avec (vaccin n°8) 40 millions de bacilles vivants émulsionnés dans le liquide physiologique.

Tué 18 jours après, il pesait à ce moment 570 grammes.

Localement, pas de lésion au point d'inoculation, pas de pus, pas d'abcès ; à l'autopsie, on observe :

Macroscopiquement. — *Foie*, contenant des granulations éparses blanches, analogues à des nodules tuberculeux ; congestion légère de l'organe.

Rate, très hypertrophiée, quadruplée de volume au moins, granulations et congestion.

Intestins : pas de lésions apparentes.

Histologiquement. — *Foie.* — Les vaisseaux sanguins sont extrêmement dilatés ; les parois des capillaires ont par endroits perdu leur endothélium et revêtent de ce fait le type embryonnaire.

La cellule hépatique a perdu sa forme polyédrique ; le protoplasma est plus ou moins granuleux.

L'architecture hépatique est troublée par l'énorme dilatation des capillaires qui ont éclaté par endroits. Les travées sont infiltrées de leucocytes et l'on peut observer à l'intérieur de l'organe des abcès hépatiques.

A la coupe, ces abcès dont les dimensions ne dépassent pas 4 à 5 millimètres de diamètre se présentent de la façon suivante : Le centre est occupé par une masse non différenciée, homogène ; les contours n'en sont pas nets et circonscrits. Si l'on s'avance vers les bords, on commence à apercevoir des débris nucléaires, puis une infiltration lymphocytaire abondante; les globules blancs sont mêlés à de nombreuses cellules embryonnaires et au sein de ce tissu dégénéré, on observe de petites lacunes remplies de la même masse homogène que celle qui constitue l'abcès.

Les nombreuses lacunes qui entourent le centre du foyer de nécrose communiquent vraisemblablement avec lui et représentent une ébauche d'abcès aréolaire.

Si l'on continue à s'éloigner du centre de ce noyau, des cellules embryonnaires se laissent bientôt infiltrer

d'un tissu conjonctif qui, se réunissant en faisceaux sépare plus ou moins le tissu sain de ces parties détruites.

La rate a perdu son aspect folliculaire; elle est infiltrée complètement de cellules embryonnaires et de leucocytes et présente des capillaires dilatées.

Taux des agglutinines	1/1.000
Taux des lysines.	1/1.500

Expérience n° 2.

Cobaye n° 14. Inoculé avec le vaccin n° 9 de Nicolle, Conor et Conseil.

Poids au moment de l'inoculation : 400 grammes.

Poids au moment de l'autopsie, 18 jours après : 380 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie* normal macroscopiquement; quelques adhérences dues à une légère périhépatite.

Rate normale; pas de points blancs nodulaires. Hypertrophie à peine accusée.

Histologiquement. — *Foie.* — Nous avons observé quelques foyers de nécrose analogues à ceux décrits chez le cobaye n° 3. Foyers bien plus discrets, tissu hépatique bien mieux conservé.

Rate. — La structure folliculaire était conservée; on ne notait qu'une congestion assez marquée de l'organe.

Taux des agglutinines	1/1.000
Taux des lysines.	1/500

Expérience n° 3.

Cobaye n° 13 inoculé avec le vaccin n° 10 de Besredka.

Poids de l'animal au moment de l'inoculation : 455 grammes.

Poids au moment du sacrifice : 410 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie* normal en apparence macroscopiquement.

Rate normale ; pas de foyers nodulaires, ni hypertrophie.

Histologiquement. — Le foie et la rate ne sont le siège d'aucune lésion dégénérative; la structure des organes est conservée.

Taux des agglutinines	1/500
Taux des lysines.	1/1.000

Vaccins avec bacilles chauffés.

Expérience n° 4.

Cobaye n° 8, vaccin n° 1.

Comme nous l'avons fait remarquer précédemment, ce vaccin préparé par l'action de la chaleur à 56° sur les bactéries n'était pas stérile, les bacilles avaient résisté à cette température.

Poids de l'animal au moment de l'inoculation : 700 grammes.

Poids au moment du sacrifice : 700 grammes.

Macroscopiquement. — *Le Foie* présentait un petit foyer de nécrose secondaire à la surface antérieure de l'organe.

La *rate* ne se trouvait pas hypertrophiée, mais cultivée, elle donnait des bacilles.

Histologiquement. — Les lésions constatées apparaissaient assez discrètes dans le foie, très circonscrites et presque nulles dans la rate.

Taux des agglutinines	1/1.000
Taux des lysines.	1/125

Expérience n° 5.

Cobaye n° 17 Vaccin n° 2 (bacilles chauffés à 80° durant 2'; non stérile.

Poids avant l'inoculation : 515 grammes.

Poids au moment du sacrifice : 520 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie* d'apparence normale.

Rate légèrement hypertrophiée avec des foyers de nécrose discrets.

Histologiquement. — Le foie avait gardé son architecture; les cellules étaient également conservées. La rate était un peu congestionnée.

Taux des agglutinines	1/500
Taux des lysines.	1/250

Expérience n° 6.

Cobaye n° 16. Vaccin n° 3 (bacilles chauffés à 90° durant 2'.

Poids de l'animal avant l'inoculation : 525 grammes.

Poids de l'animal au moment du sacrifice: 530 grammes.

Macroscopiquement. — Pas de lésions apparentes ni au foie ni à la rate.

Histologiquement. — Le foie apparaissait assez congestionné, sans lésions dégénératives des cellules.

Taux des agglutinines	1/125
Taux des lysines.	1/1.000

Expérience n° 7.

Cobaye n° 12. Vaccin n°4 (bacilles tués au bain-marie 100° pendant 8').

Poids au moment de l'inoculation : 555 grammes.

Poids au moment de l'autopsie : 600 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie* normal.

Histologiquement. — Rate rien de particulier à signaler

Taux des agglutinines	1/40
Taux des lysines.	1/125

Expérience n° 8.

Cobaye n° 15. Vaccin n° 5.

A propos de l'expérimentation de ce vaccin qui est celui de Wright-Leishman, nous devons faire remarquer que le premier cobaye injecté avec une préparation normale de 40 millions de bacilles est mort en 48 heures sans lésions apparentes des viscères ; à l'autopsie une grosse congestion des organes abdominaux. La mort ne paraît donc pas être survenue comme chez les animaux sur lesquels nous avons éprouvé la virulence du Para B et qui présentaient à l'autopsie une périhépatite et périsplénite, exsudatives très marquées, une purée de bacilles dans le foie et dans la rate.

Non, cet animal mort après l'action du vaccin de Wright paraît avoir succombé à l'action toxique de la préparation.

Nous nous sommes assuré que ce vaccin avait été bien préparé selon la technique des auteurs, nous devons dire, étant donné que Wright recommande de laisser vieillir son vaccin que notre préparation n'était pas vieille de 2 jours. Nous recommençâmes en observant plus rigoureusement les précautions indiquées et ce sont les résultats de cette deuxième épreuve que nous donnons ci-dessous :

Poids de l'animal avant l'inoculation : 510 grammes.

Poids de l'animal au moment de l'autopsie : 450 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie* : pas de foyer de nécrose.

Histologiquement. — *Rate* un peu chagrinée sans abcès. Nous n'avons pu observer dans le foie et dans la rate aucune lésion, aucun abcès, mais seulement une congestion légère des deux organes.

Taux des agglutinines	1/20
Taux des lysines.	1/1.500

Expérience n° 9.

Cobaye n° 9. Vaccin n° 6 (bacilles chauffés à 56° pendant 1 heure, additionnés de crésol 2 p. 100).

Poids avant l'inoculation : 645 grammes.

Poids au moment de l'autopsie : 640 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie* d'apparence normale.

Rate légèrement hypertrophiée, ne contenant pas de bacilles.

Histologiquement. — La congestion du foie était assez marquée; quelques capillaires se trouvaient dilatés et transformés en véritables lacs sanguins. La rate était également congestionnée.

Taux des agglutinines	1/600
Taux des lysines	1/250

Expérience n° 10.

Cobaye n° 10. Vaccin n° 7 (bacilles chauffés à 60° pendant 2 heures, additionnés de 3 p. 100 acide phénique et chauffés à nouveau à 60° durant 1/2 heure).

Poids de l'animal avant l'inoculation : 580 grammes.
Poids au moment de l'autopsie : 630 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie* normal, pas d'adhérences. *Rate* normale.

Histologiquement. — Rien à signaler.

Taux des agglutinines	0
Taux des lysines.	1/125

Vaccins avec bacilles tués par les agents chimiques.

Expérience n° 11.

Cobaye n° 6. Vaccin n° 11 (bacilles tués par l'acide phénique 1/2 p. 100).
Poids au moment de l'inoculation : 760 grammes.
Poids au moment de l'autopsie : 760 grammes.

Macroscopiquement. — *Foie et rate* normaux.

Histologiquement. — *Foie et rate* également normaux.

Taux des agglutinines	1/125
Taux des lysines.	1/250

Expérience n° 12.

Cobaye n° 7. Vaccin n° 12 (bacilles tués à l'éther).
Poids au moment de l'inoculation : 650 grammes.
Poids au moment de l'autopsie : 660 grammes.

Macroscopiquement et Histologiquement. — *Foie*, petits points blancs 2 à 3. *Rate*, rien.

Taux des agglutinines 1/40
Taux des lysines. 1/750

Nous résumons dans le tableau suivant les résultats de nos recherches :

TAUX DES LYSINES		TAUX DES AGGLUTININES	
1/1.500	Vaccin avec bacilles vivants (n° 8). Vaccin de Wright Leishman (n° 5).	1/1.000	Vaccin avec bacilles vivants (n° 8). Vaccin de Nicolle, Conor et Conseil (n° 9). Vaccin avec bacilles chauffés à 55° pendant 2 heures (n° 1).
1/1.000	Vaccin de Besredka (n° 10). Vaccin avec bacilles tués par la chaleur à 90° pendant 2 minutes (n° 3).	1/600	Vaccin avec bacilles chauffés à 55° additionnés de crésol (n° 6).
1/750	Vaccin avec bacilles tués à l'éther (n° 11).	1/500	Vaccin de Besredka (n° 10). Vaccin avec bacilles tués à 80° (n° 2).
1/500	Vaccin avec bacilles tués par l'acide phénique (n° 12). Vaccin avec bacilles tués par la chaleur à 80° pendant 2 minutes (n° 2). Vaccin avec bacilles chauffés à 55° additionnés de crésol à 2 p. 100 (n° 6).	1/125	Vaccin avec bacilles tués à 90° 2 minutes (n° 3). Vaccin avec bacilles vivants tués par l'acide phénique (n° 1).
1/125	Vaccin avec bacilles chauffés à 55° (n° 1). Vaccin avec bacilles tués au bain-marie 10 minutes (n° 4). Vaccin avec bacilles chauffés à 55°, tués par l'acide phénique et réchauffés à nouveau à 60° pendant une 1/2 heure (n° 7).	1/40	Vaccin avec bacilles vivants tués par l'éther (n° 11). Vaccin avec bacilles tués au bain-marie à 100° 10 minutes (n° 4).
		1/20	Vaccin de Wright Leishman (n° 5).
		0	Vaccin avec bacilles chauffés à 55° additionnés d'acide phénique et réchauffés pendant une demi-heure (n° 7) (Pfeiffer et Kolle).

CHAPITRE VI

CRITIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS

Comparaison des pouvoirs agglutinogènes

Si nous examinons le tableau représentant le pouvoir agglutinogène de chacun des vaccins étudiés, nous voyons que les plus agglutinogènes sont ceux dans lesquels les bacilles sont demeurés vivants ; celui qui a été chauffé à 55°, nous l'avons dit, n'est pas stérilisé par cette température et se comporte au point de vue des agglutinines comme les bacilles vivants.

Relations entre le pouvoir agglutinogène et le pouvoir infectieux des vaccins.

Les trois vaccins qui ont donné un taux d'agglutination égal à 1/1000e n'ont pas produit chez l'animal les mêmes troubles morbides ; cependant on peut voir que chacun de ces vaccins a exercé sur le cobaye une action

infectieuse ou toxique nette qui s'est traduite en premier lieu et cliniquement, pourrait-on dire, par une perte de poids : le vaccin nº 8 a fait maigrir l'animal de 20 grammes, le vaccin nº 9 également. Quant au vaccin nº 1, l'animal qui l'a reçu pesant déjà 700 grammes, se trouvait, on le conçoit, particulièrement résistant, et le fait pour lui de n'avoir pu conserver que ce poids malgré la nourriture fort substantielle qu'on lui donnait, montre déjà une atteinte de son état général.

Le vaccin nº 6, quoique stérile, a donné un taux d'agglutinines fort élevé; nous constatons encore que le poids de l'animal a dans ce cas diminué de 5 grammes. Il en est de même du vaccin nº 10 qui a fait maigrir l'animal de 45 grammes.

Le vaccin nº 2 dont le pouvoir agglutinogène égale encore 1/500e n'a pas fait maigrir le cobaye qui a même pris 5 grammes pendant les 18 jours d'action du vaccin, mais si l'infection ne s'est pas manifestée chez lui par de la dénutrition, elle se montre par les nombreux foyers de nécrose constatés dans la rate de ce dernier animal.

On peut en somme dire que tous les vaccins qui précèdent ayant un pouvoir agglutinogène supérieur à 1/500e, ont exercé sur le cobaye une action infectante très nette, qui s'est traduite soit par des lésions viscérales, soit par un amaigrissement plus ou moins notable.

Les autres vaccins dont le pouvoir agglutinogène est plus faible ne paraissent pas avoir eu une action pathogène aussi marquée que les précédents, les animaux qui les ont reçus ont engraissé le plus souvent, ou dans

tous les cas n'ont pas présenté de foyers nécrotiques dans les viscères.

Ces conclusions ne seraient pas rigoureusement exactes si nous ne faisions une place à part au vaccin de Wright qui nous a plusieurs fois trompé dans nos prévisions. Dans ce vaccin, les bactéries sont injectées en même temps que le bouillon dans lequel elles ont vécu, poussé, et dans lequel quelques-unes sont également mortes avant d'être stérilisées.

Une telle préparation nous a, contre toute attente, tué un animal en moins de 48 heures; nous avons attribué cette mort au pouvoir toxique de la préparation dû peut-être à ce que celle-ci n'était pas suffisamment vieillie : voici que dans notre deuxième expérience, l'animal n'est pas tué, mais il maigrit de 60 grammes (c'est celui qui s'est le plus émacié). Nous nous attendions à avoir un taux d'agglutinines élevé, ce taux est faible. Comment expliquer un tel résultat?

Si l'on examine les choses de plus près, on voit que ce vaccin ne comptait pas plus de corps microbiens que les autres préparations, ces bactéries étaient stérilisées par la chaleur et le lysol; il se trouve donc en réalité bien à sa place dans le tableau des agglutinines, juste avant le vaccin de Pfeiffer et Kolle qui comme lui contient 40 millions de bacilles stérilisés par la chaleur et l'acide phénique. Ces deux vaccins se ressemblent par ce côté que les microbes ont dans chacun d'eux subi à peu près la même action stérilisante, action combinée de la chaleur et d'un antiseptique.

Le dernier, loin d'avoir fait maigrir l'animal de

60 grammes comme le premier, l'a laissé engraisser d'autant ; la différence entre les résultats cliniques des deux vaccins ne peut être due aux corps bacillaires qui ont subi à peu près la même désintégration dans les deux cas; il faut en chercher la raison dans l'excipient, et c'est à notre avis, le bouillon qui joue le rôle toxique observé.

Ce bouillon contient une grande quantité de toxines élaborées par les bacilles pendant leur germination ; il en contient d'autres, apportées par l'autolyse d'une certaine quantité de microbes; c'est là, pensons-nous qu'il faut voir la raison des troubles cliniques observés. Ces toxines n'étant pas agglutinogènes, il n'y a aucun motif pour que le taux des agglutinines corresponde dans ce cas au pouvoir toxique.

Si nous considérions l'agglutination comme une réaction d'immunité, nous condamnerions donc irrémédiablement le vaccin de Wrigth comme peu ou presque pas agglutinogène et très toxique.

Les travaux de M. Widal ne permettent pas un tel jugement. Les agglutinines ne peuvent être considérées comme une réaction d'immunité. On trouve des agglutinines chez les infectés à un taux plus élevé que chez les immunisés et nos expériences viennent à l'appui de ces conclusions, à savoir que *la réaction agglutinogène est d'autant plus forte que l'infection est plus accentuée.*

En chauffant les bacilles, on diminue à partir de 60 degrés leur pouvoir agglutinogène d'autant plus qu'on les chauffe davantage.

Mais l'action de la chaleur sur eux paraît, dans une

certaine mesure, moins porter atteinte à leur pouvoir agglutinogène que l'action des antiseptiques.

L'éther, l'acide phénique sur les bacilles vivants diminuent leur pouvoir agglutinogène dans des proportions considérables.

D'autre part, nous avons deux vaccins chauffés à 56 degrés, par conséquent non stériles : l'un a été soumis secondairement à l'acide phénique, le n° 7; il donne un taux d'agglutinines égal à 0; l'autre a été soumis à l'action du crésol et donne une agglutination à 1/600e. Ces deux préparations sont toutes les deux stériles, mais l'acide phénique paraît avoir plus profondément détruit la substance agglutinogène des microbes que ne l'a fait le crésol. Ce détail montre qu'il y a lieu de faire un choix judicieux parmi les antiseptiques.

Nous avons deux autres vaccins :

Dans l'un, les bacilles vivants ont été tués à l'éther. C'est le n° 11; il donne un taux d'agglutination de 1/40e.

Dans l'autre, ils ont été tués à l'acide phénique; il donne une agglutination à 1/125e.

L'éther paraît donc être de tous les antiseptiques que nous avons essayés celui-ci qui détruit le plus complètement le pouvoir agglutinogène des microbes.

Pour arriver à une destruction plus complète que celle donnée par l'éther seul, on est obligé de faire agir la chaleur à 60°, simultanément avec l'acide phénique, et secondairement de chauffer encore à 60° durant 1/2 heure comme il a été fait dans la préparation du vaccin de Pfeiffer et Kolle.

Si nous admettons que le taux des agglutinines est d'autant plus faible, que l'infection causée par le vaccin est moins importante, pour avoir sous les yeux le degré d'inocuité des préparations étudiées par nous, il suffira de lire de bas en haut la partie droite du tableau qui précède, le vaccin le plus inoffensif étant le nº 7.

Certains auteurs qui liront de bas en haut la partie droite du tableau, pensant avoir comme nous venons de le dire la liste des vaccins par ordre d'inocuité pourront être étonnés parfois de la place qui est assignée à quelques-uns d'entre eux.

On observe par ce moyen que le plus inoffensif des vaccins serait celui de Pfeiffer et Kolle, et cependant nos prisonniers savent qu'une telle préparation donne des réactions souvent importantes. Il y a lieu d'apporter à ce fait plusieurs explications. Les prisonniers qui ont été vaccinés avec le vaccin allemand nº 7 et qui accusent parfois de violentes réactions, ont-ils pu comparer les phénomènes qu'ils décrivent à ceux que produit le vaccin de Vincent à l'éther. Certains soldats français interrogés n'hésiteraient pas, pensons-nous, à affirmer que ce vaccin donne des réactions violentes. Le tout est d'établir entre les deux vaccins une comparaison clinique exacte.

Si cela pouvait être et si les réactions cliniques qui suivent l'injection de l'un et de l'autre pouvaient être strictement dosées, il resterait encore à voir si les quantités injectées dans les deux cas ont été rigoureusement égales.

On a vu effectivement en Allemagne le vaccin de

Pfeiffer et Kolle donner des réactions extrêmement violentes, mais à ce moment, les doses vaccinales étaient vraiment excessives et bien au-dessus de celles employées avec les autres préparations.

Dans l'appréciation du facteur réactionnel toxique ou infectieux, il faut toujours avoir soin de faire intervenir l'élément quantitatif dont l'importance est considérable.

Comparaison des pouvoirs lysogènes.

Les résultats d'une telle observation quoique intéressants, n'auraient pas été complets si nous n'avions pu mettre en regard du pouvoir agglutinogène de chaque vaccin son pouvoir lysogène.

Il ne suffit pas pour conclure de pouvoir dire tel vaccin est le plus inoffensif... Il faut encore pouvoir déterminer son efficacité et de même que lorsqu'on apprécie un médicament on doit faire la part de sa toxicité et de son pouvoir curatif, de même, pour apprécier un vaccin, faut-il connaître ces deux facteurs.

Et qu'on ne s'attende pas, malgré toutes ces données, à trancher définitivement la question du meilleur vaccin ; il restera toujours une place pour le choix, et chacun pourra à sa guise opter pour l'un ou pour l'autre suivant qu'il préfère sacrifier un peu l'inocuité au profit d'un fort et rapide pouvoir lysogène, ou que plus timoré il entende utiliser un vaccin moins lysogène mais plus inoffensif.

Vaccins à bacilles vivants. — La lecture de la partie gauche du tableau nous montre que les bacilles vivants ne déterminent pas plus de bactériolysines que le vaccin de Wright qui est stérile; ce dernier apparaîtrait donc comme le meilleur vaccin (très lysogène, peu agglutinogène) s'il n'était doué d'un pouvoir toxique sur lequel nous nous sommes longuement étendu.

Le taux de bactériolysines 1/1000e est atteint par le vaccin de Besredka, et cela n'a *a priori* rien d'étonnant, puisque ce dernier comporte des bacilles vivants.

Nous ne pouvons en revanche qu'être surpris de voir les 3 vaccins à bacilles vivants. — n° 8, 9, 10 et 1 qui présentaient un pouvoir agglutinogène considérable, accuser des pouvoirs lysogènes fort différents.

Le vaccin de Nicolle est moins lysogène que les préparations de bacilles vivants, moins encore que le vaccin de Besredka qui était cependant plus agglutinogène que lui.

Quant aux bacilles soumis à la chaleur à 55° qui sont demeurés vivants malgré cela et qui donnent un taux d'agglutinines égal aux vaccins à bacilles vivants il présente un pouvoir lysogène très inférieur à beaucoup de vaccins stériles.

Voici donc les pouvoirs lysogènes de tous les vaccins à bacilles vivants :

Emulsion pure.	1/1.500
Vaccin Besredka	1/1.000
Nicolle, Conor et Conseil. . . .	1/500
Bacilles chauffés 55°.	1/125

A ne lire que ces quatre résultats, on pourrait conclure que toute atteinte aux corps microbiens diminue leur pouvoir lysogène : ce ne serait pas exact. Tout ce qu'on peut dire en présence de ces quatre chiffres, c'est que les bacilles vivants lavés et débarrassés des corps morts sont moins lysogènes qu'une émulsion non purifiée. Un tel résultat apparaîtra précieux à ceux qui sont partisans des autolysats.

Vaccins à bacilles soumis à l'action de la chaleur. — Nous avons vu que les vaccins soumis à l'action de la chaleur sont d'autant moins agglutinogènes que l'action calorique a été plus intense ou plus prolongée.

Il s'en faut qu'une même règle préside aux variations du pouvoir lysogène ; nous voyons toute autre chose en effet en lisant le tableau.

Il nous est facile de constater que le microbe soumis à une température de 55° et « non tué », n'est pas plus lysogène que celui qui a été tué par la chaleur au bain-marie.

Par contre, ces deux vaccins sont moins lysogènes que celui qui est obtenu par l'action de la chaleur à 80°, lequel l'est moins encore que celui qui a été soumis à une température de 90° pendant deux minutes.

Il faudrait donc admettre que 90° représentent une température optimum, qui détruit suffisamment le microbe pour le stériliser, sans lui enlever ses propriétés lysogènes.

Ce fait fut pour nous une surprise et nous avons attaché beaucoup de soins à sa détermination.

Nous avons pu voir aussi le vaccin de Besredka avec des bacilles vivants ne pas donner plus de lysines que le vaccin stérilisé par la chaleur à 90°, et le vaccin de Nicolle, Conor et Conseil également à bacilles vivants en donner moins encore que ce dernier.

Les raisons de ces faits restent obscurs.

On peut se demander pourquoi une température de 55° qui ne détruit pas le bacille et une température de 80° qui ne les détruit qu'incomplètement donnent des préparations moins lysogènes qu'une température de 90°. Nous ne pouvons pas quant à présent donner d'explication à ce phénomène, nous nous contentons d'observer que des bacilles chauffés à 55°, sont moins lysogènes que ceux chauffés à 80°. Ces derniers le sont moins que ceux chauffés à 90°, et que si on dépasse cette température, le pouvoir lysogène au lieu de continuer à augmenter diminue.

On ne peut pas dire que le pouvoir lysogène est d'autant plus fort que la destruction bacillaire est plus intense puisque les bactéries chauffées à 100° ne sont presque pas lysogènes, puisque celles chauffées à 55° additionnées d'acide phénique et réchauffées à 60° et dont l'inocuité est démontrée par un pouvoir agglutinogène nul ne sont presque pas lysogènes.

Il faut donc par l'action de la chaleur arriver à un juste milieu entre la destruction bacillaire intense et la conservation de la virulence microbienne.

Il ne serait pas étonnant qu'à chaque espèce microbienne corresponde une température optimum qui laisse à la préparation vaccinale un fort pouvoir lyso-

gène et lui enlève une grande partie de son pouvoir toxigène.

Cette hypothèse était en fait adoptée pour les bacilles typhiques et paratyphiques et l'on pensait que la température optimum dont il est question n'était autre que celle qui se trouvait juste suffisante pour tuer le microbe, on se gardait même de la dépasser par crainte de porter atteinte aux propriétés des vaccins.

Nos expériences tendent à démontrer que la température de choix dans la préparation d'un microbe en vue d'établir un vaccin n'est pas celle qui suffit à le faire mourir, qu'il faut la dépasser dans une certaine mesure et ne pas trop la dépasser.

Pour le Para B qui meurt à 68° environ à condition de prolonger la durée d'exposition à cette température, il faut atteindre 90° pendant 2′ pour obtenir avec lui par la chaleur la préparation vaccinale la plus lysogène.

Le chiffre de 90° pendant 2′ ne présente pas à nos yeux une valeur absolue; il est possible qu'on puisse arriver aux mêmes résultats en chauffant à une plus faible température, mais en chauffant plus longtemps ou à plusieurs reprises.

Quels que soient les moyens utilisés pour obtenir par la chaleur un bon vaccin, il faut tenir compte de ce fait, que nos expériences ont mis en lumière, à savoir, que la température à soumettre le microbe n'est pas nécessairement la température limite où il trouve la mort; que cela peut être et c'est le cas du Para B, une température plus élevée.

On ne peut s'empêcher de penser que ces modestes

observations ne font qu'entr'ouvrir la porte à de nouvelles recherches et que plusieurs questions restent posées sans solutions actuelles. Nous avons vu qu'il valait mieux chauffer à 90° 2′ qu'à 80° 2′ et qu'à 56° 2 heures et qu'à 100°, 8′. Mais là ne sont pas comprises toutes les gammes de températures, ni toutes les durées pendant lesquelles on peut faire agir la chaleur.

N'est-il pas possible qu'une température de 80° maintenue 1 heure ou 2 heures donne le même résultat que celle de 90°, maintenue 2 minutes; ce sont de nombreuses expériences qu'il conviendrait de faire dans ce sens.

Vaccins à bacilles soumis aux agents chimiques. — Nous avons vu dans l'étude des agglutinines que l'éther tuait rapidement le Para B, plus rapidement peut-être que l'acide phénique, et qu'en tous cas le vaccin préparé avec le premier antiseptique était moins agglutinogène que celui préparé avec le second, ce qui tendrait à nous faire supposer que l'action de l'éther est plus énergique que celle de l'acide phénique à 2 p. 100.

L'étude des lysines relatives à ces deux vaccins nous donne des résultats fort intéressants. Nous voyons que le vaccin à l'éther est considérablement plus lysogène que le vaccin à l'acide phénique; il est donc plus avantageux de tuer les bacilles avec l'éther qu'avec l'acide phénique.

Quant aux procédés mixtes qui font agir en même temps la chaleur et un antiseptique, nos résultats ne les font pas apparaître comme particulièrement recommandables.

Il nous faut réserver une place à part au vaccin de Wright qui se distingue de tous les autres par le fait que les bacilles sont inoculés avec leur bouillon de culture après action sur le milieu de la chaleur à 55° et du lysol.

Nous avons dit ce qu'il fallait penser du pouvoir toxique de ce vaccin qui est celui qui a fait maigrir l'animal de 50 grammes en 18 jours et qui en a tué un autre en 48 heures.

Malgré ce pouvoir toxique qui, selon nous, n'est pas lié aux bactéries elles-mêmes qui sont stériles, mais au milieu qui les contient, le vaccin de Wright offre un pouvoir lysogène surprenant, puisqu'il atteint 1/1500e, chiffre obtenu seulement avec les bacilles vivants, son pouvoir agglutinogène est très faible. Il réunit donc toutes les qualités d'un excellent vaccin. Nous n'hésiterions pas à dire que c'est le meilleur vaccin de ceux que nous avons expérimentés, s'il ne nous tenait en méfiance par son pouvoir toxique extraordinaire. Quoi qu'il en soit, après l'émulsion de bacilles vivants qui ne peut être considérée comme un vaccin, la préparation de Wright est la moins agglutinogène et la plus lysogène.

Comparaison générale du pouvoir immunigène des vaccins étudiés.

S'il nous fallait fixer notre choix sur l'une des préparations que nous avons étudiées, il nous suffirait de lire de haut en bas la partie gauche du tableau de la page 86, de bas en haut la partie droite du même tableau et

d'opter pour la première préparation qui serait rencontrée à la fois dans l'une et l'autre liste.

En opérant ainsi, c'est le vaccin de Wright qui se présente avec un pouvoir lysogène de 1/1500ᵉ et un pouvoir agglutinogène de 1/20ᵉ. Nous avons dit que ce vaccin nous paraissait avoir un pouvoir toxique qui justifiait notre prudence à son égard.

Après lui, c'est le vaccin à l'éther qui se trouve présenter le maximum de garanties et nous sommes contraint de dire que c'est, suivant notre méthode d'opération et vis-à-vis du cobaye, la plus immunigène et la moins toxique des préparations vaccinales étudiées par nous.

Une telle affirmation ne va pas sans réserves, et nous devons insister sur le fait que nous n'avons pas expérimenté tous les vaccins connus ; l'aurions-nous fait nous ne serions pas en droit d'inférer que ce qui se passe chez le cobaye se rencontre chez l'homme. Il ne faut pas oublier non plus que nous n'avons étudié que le Para B dont les caractères généraux sont assez différents de ceux du bacille typhique. La clinique humaine garde toujours ses droits envers et contre toutes les décisions expérimentales. Le cobaye ne nous renseigne qu'assez mal sur le pouvoir toxique des vaccins, et le pouvoir toxique est un facteur dont il faut tenir un compte sérieux, les variations de cette toxicité semblant régies par des lois mystérieuses. A peine peut-on à cet égard énoncer quelques règles basées sur l'expérience.

Nous avons pu observer que pour diminuer le pouvoir toxique des vaccins, il y avait intérêt à tuer les bacilles

le plus rapidement possible pour éviter l'autolyse des microbes. Nous avons énoncé dans une communication récente à la Société de Biologie, qu'une émulsion de bactéries dans le sérum physiologique était beaucoup plus pathogène lorsqu'on l'injectait au bout de 24 heures que lorsqu'on l'inoculait immédiatement après sa préparation. Nous avons attribué une partie de l'exaltation de cette toxicité à la multiplication des corps microbiens, des numérations nous ayant montré que les bacilles avaient poussé dans l'eau salée au point de passer de 40 millions à 180 millions; il est possible qu'une autre part de l'augmentation du pouvoir pathogène revienne aux bacilles morts puisque d'autres expériences nous ont montré que les bacilles vivants étaient moins pathogènes qu'un mélange de bacilles morts et vivants. Nous croyons donc que des bacilles chauffés à 90° pendant 2 minutes sont moins pathogènes que ceux chauffés à 70° par exemple pendant 2 heures, en admettant que les deux préparations soient également stériles. Nous avons réservé dans nos appréciations les droits des vaccins que nous n'avions pas pu expérimenter.

Parmi ces derniers, il en est qui se rapprochent assez sensiblement de nos préparations; il en est d'autres qui s'en éloignent assez considérablement et qu'on ne peut comparer en aucune façon avec ceux qui ont fait l'objet de ce travail. Parmi ces derniers est celui de MM. Le Moignic et Césari. Le lipo-vaccin se distingue non seulement par la façon dont les bacilles ont été stérilisés, mais par l'excipient donné à ces bacilles; ces deux facteurs ont une importance capitale.

Nous avons donné les raisons qui ne nous ont pas permis d'étudier ce dernier vaccin ; elles résident dans une difficulté de technique. La préparation du lipo-vaccin nous mettait dans l'impossibilité d'établir un antigène comportant 40 millions de bacilles.

RÉSUMÉ

Ces différentes constatations étant faites, il nous paraît utile de grouper ce travail analytique en une synthèse générale qui fixant notre but et les résultats acquis, ne laisse aucune place aux interprétations trop étendues auxquelles on pourrait se livrer.

Il importe également que, par des procédés d'induction on n'arrive pas à donner à nos résultats une portée que nous-même ne leur reconnaissons pas.

Nous avons dit dans notre Introduction qu'une étude comparative du pouvoir immunigène des vaccins antityphiques préparés jusqu'à ce jour serait du plus haut intérêt prophylactique. Mais une telle étude représente un travail qu'une existence humaine laborieuse ne suffirait pas à terminer.

La question est très complexe; les facteurs qui font varier la valeur d'un vaccin sont très nombreux, et peut-être encore plus nombreux que nous ne l'imaginons. Des vaccins ne sont point les mêmes quand ils sont préparés avec des microbes de races différentes provenant de milieux différents, d'âges différents; leur pou-

voir varie si l'on fait varier le nombre de microbes entrant dans leur composition. Et les façons de préparer ces bactéries, de faire agir sur eux des substances chimiques ou des agents physiques sont encore des moyens de changer leur pouvoir immunigène.

Ce petit aperçu de quelques-unes des causes qui peuvent modifier la valeur d'un vaccin suffit à montrer l'étendue de la question. C'est assez dire que notre ambition n'a pas été de la résoudre complètement, mais de l'entamer par un de ses côtés.

Ainsi le premier temps de notre étude a été de limiter notre tâche.

Nous avons fait choix d'un bacille, le Para B ; ayant obtenu des émulsions de ce bacille, nous les avons très exactement dosées en unités bactériennes. Nous avons fait subir à chacune de ces émulsions des traitements physico-chimiques variés, et nous obtînmes ainsi des vaccins qui, étant préparés avec le même bacille sur le même milieu, avec la même quantité exacte de microbes, ne différaient que par le traitement subi par les bactéries.

Dans ces conditions, si chacun de ces vaccins injectés à des animaux identiques leur conféraient une immunité différente, il y avait lieu selon toute évidence d'attribuer cette dissemblance dans les effets aux seuls facteurs qui avaient varié dans la cause, à savoir la préparation des microbes.

Un certain nombre de difficultés se présentaient pour mener ce travail ; nous nous contentons de les signaler de nouveau ici ayant longuement établi au cours de l'exposé

de notre étude la façon dont nous les avons solutionnées.

Il fallait opérer sur un seul microbe, la tâche aurait été trop lourde si nous avions dû expérimenter les 3 bacilles typhiques.

Nous avons choisi le Para B, à cause de sa virulence pour le cobaye que nous avions pris comme animal d'expérience.

Il fallait que ce microbe ne soit pas sujet à varier de virulence suivant les différents repiquages; nous avons pris un échantillon aussi stable que possible.

Il fallait s'assurer de la légitimité du microbe choisi ; nous avons étudié longuement ses caractères généraux et ses caractères antigènes.

Il fallait encore choisir et se familiariser avec une méthode de numération bactérienne.

Il fallait expérimenter la virulence sur le cobaye et doser quantitativement cette virulence. Nous avons déterminé qu'une quantité supérieure à 40 millions de bacilles tuait un cobaye de 500 grammes en 24 heures, qu'une quantité inférieure ne lui donnait qu'une bacillémie importante, grosse rate, nécrose en foyer du foie, dénutrition, etc.

Les réactions du cobaye normal contre le Para B ainsi étudiées, nous pûmes commencer nos travaux.

Ayant pris comme base quantitative de nos vaccins le chiffre de 40 millions de bacilles, nous avons fait agir sur eux tantôt la chaleur à différents degrés, tantôt des antiseptiques, tantôt combiné l'action de ces deux agents, physico-chimiques.

J'entends bien que nous aurions pu limiter davantage

notre travail, rechercher seulement par exemple l'action de la chaleur à différents degrés sur les microbes; ceux-ci peuvent être différemment impressionnés non pas seulement par le degré atteint, mais par le temps pendant lequel la température a été maintenue.

Nous avons dit qu'une température de 90° pendant 2 minutes était un chiffre optimum relativement au pouvoir lysogène, mais qui nous dit que 80° durant une heure ne donneraient pas un meilleur résultat.

Des points d'interrogation subsistent, et si nous n'avons pu être complet, c'est pour avoir voulu davantage contrôler ce qui avait été fait jusqu'à ce jour. Nous avons essayé des vaccins qui se rapprochent autant que possible de ceux établis par les auteurs. Ce que notre travail a perdu en documentation scientifique, il l'a gagné, pensons-nous, en intérêt pratique.

Ainsi nos vaccins, établis, comportant tous 40 millions de bacilles, ont été injectés sous la peau de cobayes sains de 500 grammes environ.

Pour déterminer l'effet produit sur ces animaux, quelle méthode fallait-il prendre ? Devions-nous attendre quelques semaines et leur faire ingérer des cultures pures pour éprouver leur immunité ? Mais quel moyen quantitatif de contrôle aurions-nous possédé? Comment aurions-nous pu comparer tel animal survivant à tel animal mort, ne sachant combien de microbes avait ingéré l'un et l'autre?

Fallait-il éprouver les immunités par la méthode des injections virulentes? Mais supposons que nous ayons injecté secondairement 100 millions de bacilles à chaque

cobaye, dose mortelle pour un animal sain, et supposons que 3 d'entre eux meurent, que 13 restent vivants... Quelle conclusion tirer? Que les 13 vaccins correspondants sont supérieurs aux 3 autres et rien de plus, et l'expérience ne peut être recommencée sur les 13 survivants, car les conditions ne sont plus les mêmes, l'injection virulente ayant joué pour son compte le rôle de vaccin.

Nous n'avons pu accepter une telle méthode et nous avons préféré adopter d'autres procédés.

Nous avons observé soigneusement nos animaux pendant 18 jours, nous les avons pesés pour nous rendre compte de leur état de plus ou moins grande dénutrition. Nous les avons sacrifiés au bout de ce temps.

L'examen histologique des viscères fut fait.

L'examen cultural de la rate également.

Dans le sérum, nous dosâmes les agglutinines et les lysines.

Est-ce à dire que nous attribuons la même valeur à chacun de ces procédés d'investigation?

Non certes, et nous sommes loin de penser que les agglutinines représentent une réaction d'immunité, mais on ne peut nier que leur étude présente quelque intérêt. Nous avons estimé que le pouvoir lysogène était encore plus indispensable à évaluer, qu'il pouvait représenter jusqu'à un certain point le degré d'immunité acquis par l'animal. Hâtons-nous de dire que cette opinion n'est encore qu'une hypothèse confirmée par certains faits et sur laquelle nous nous sommes basé dans l'étude de l'immunité chez nos animaux.

Des expériences que nous avons pu effectuer, il résulte :

que l'examen clinique, la courbe de poids en particulier, et l'examen histologique nous ont donné des renseignements sur le pouvoir toxi-infectieux des vaccins.

Nous avons pu observer ainsi que le taux des agglutinines était d'autant plus élevé que l'état général de l'animal avait été plus atteint.

Ce parallélisme entre le pouvoir agglutinogène des vaccins et leur pouvoir infectant nous paraît établi et confirme le fait que l'agglutination n'est pas une réaction d'immunité, mais une réaction d'infection. Nous confirmons ainsi de nouveau l'opinion de Widal et nous la formulons plus loin encore en disant que *la réaction d'agglutination mesure la réaction d'infection.*

Un vaccin est donc d'autant plus inoffensif qu'il est moins agglutinogène, mais il ne suffit pas qu'un vaccin soit peu agglutinogène pour qu'il soit inoffensif. Ainsi le vaccin de Wright est peu agglutinogène, il nous a paru cependant un des plus toxiques puisqu'il nous a tué un cobaye en 48 heures et en a fait cachectiser un autre. Nous croyons que cette préparation est toxique par son excipient qui est le bouillon même dans lequel les bacilles ont poussé; pouvoir toxique et pouvoir infectieux sont deux facteurs différents, et c'est cette distinction qui permet de ne pas s'étonner de la place occupée par le vaccin de Wright dans l'échelle du pouvoir agglutinogène.

Le pouvoir lysogène est loin d'être parallèle au pouvoir agglutinogène, tandis que ce dernier est d'autant moins élevé que les bacilles ont été plus altérés, le premier varie selon des lois qui nous échappent encore.

La chaleur exerce sur les microbes une action qui

varie selon son intensité et la durée pendant laquelle on la fait intervenir.

A 55° pendant 2 heures, elle abaisse considérablement le pouvoir lysogène et cependant à cette température les microbes ne sont pas tués et ils sont encore très agglutinogènes.

A 80° pendant 2 minutes, le pouvoir lysogène est un peu plus élevé qu'à 55°; si l'on continue à augmenter la température, le pouvoir lysogène augmente parallèlement jusqu'à 90° pendant 2 minutes où il atteint son maximum; à partir de ce point thermométrique, si on continue à chauffer, le pouvoir lysogène diminue.

La température à 90° paraît donc être pour le Para B une température optimum, qui, à la condition d'être prolongée seulement 2 minutes, conserve aux microbes le maximum de leurs facultés lysogènes.

Ce fait est intéressant : les auteurs admettent que la température juste suffisante pour tuer le microbe, est la température qui leur conserve le mieux leur pouvoir immunigène. Il faudrait donner plus de précision à ce fait; il n'y a pas qu'une température qui soit juste capable de tuer le microbe; beaucoup peuvent le tuer selon le temps pendant lequel on maintient son action. Le Para B est tué par 68° pendant 2 heures, par 80° pendant 4 minutes, par 90° pendant 2 minutes, etc.

Il s'agit de savoir si le bacille est moins désagrégé par une température basse, prolongée, que par une température plus haute agissant rapidement. Nous avons des raisons de préférer ce dernier procédé pour stériliser les vaccins.

La stérilisation peut être obtenue par des antiseptiques et il est hors de doute que les agents chimiques se comportent différemment vis-à-vis des éléments microbiens. L'éther nous a semblé être celui de ceux que nous avons examinés qui conserve le plus grand pouvoir lysogène aux microbes.

Notre opinion pour l'appréciation d'un vaccin est ainsi formulée : « La meilleure préparation est celle qui présente le plus petit pouvoir agglutinogène, le plus grand pouvoir lysogène, le plus faible pouvoir toxique ».

Pour juger un vaccin il y a donc trois éléments importants à envisager. Les deux premiers : pouvoir lysogène et pouvoir agglutinogène sont évalués par le laboratoire. Le troisième élément, le pouvoir toxique, n'est mis en valeur que par la clinique, et celle-ci dans l'appréciation d'un vaccin garde tous ses droits.

Nos résultats n'ont d'ailleurs de valeur que pour le Para B, et nous nous garderions d'inférer que ce qui se passe chez le cobaye se présente chez l'homme. Il est de plus des vaccins que nous n'avons pas pu expérimenter pour des raisons diverses ; nous le regrettons vivement et toutes ces raisons nous incitant à la plus extrême prudence, nous obligent à ne pas donner à ce travail d'autres conclusions que celles qu'il comporte.

CONCLUSIONS

L'objet de notre travail était de préparer des vaccins bactériens avec une même quantité d'un même microbe, soumis à l'action d'agents physiques et chimiques variés, et d'étudier ensuite le pouvoir lysogène et agglutinogène de chacune de ces préparations vaccinales.

De nos expériences, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Le pouvoir agglutinogène d'un vaccin est d'autant plus élevé que les microbes ont été moins altérés.

2° Confirmant les travaux de Widal, nous avons pu nous convaincre que le taux des agglutinines ne mesurait pas le pouvoir immunigène des vaccins au contraire. Il nous a paru qu'un fort pouvoir agglutinogène signifiait un fort pouvoir infectant.

3° Le pouvoir lysogène ne varie pas parallèlement avec le pouvoir agglutinogène.

Si l'on fait agir des températures progressivement croissantes sur les microbes, on commence par diminuer leur pouvoir lysogène, puis il augmente jusqu'à une température optimum et rediminue ensuite si on dépasse le chiffre de cette température élective qui peut

varier pour chaque bacille, mais qui pour le Para B et dans les conditions de nos expériences est 90°.

4° De tous les antiseptiques que nous avons essayés, c'est l'éther qui conserve le plus aux microbes leur pouvoir lysogène.

5° Nous pensons que le meilleur vaccin doit avoir un faible pouvoir agglutinogène, et un pouvoir lysogène aussi élevé que possible.

Nous avons établi ces deux éléments d'appréciation pour un certain nombre de vaccins et la lecture du tableau où nos résultats sont fixés peut être très utile.

Mais l'étude des lysines et celle des agglutinines suffit-elle à déterminer le choix d'un vaccin? Nous nous gardons d'une telle affirmation. Il n'est d'abord pas prouvé que le pouvoir lysogène représente bien le pouvoir immunigène d'un vaccin, et dans l'appréciation des préparations vaccinales il y a d'autres facteurs qui doivent intervenir, tel que leur pouvoir toxique difficile à évaluer expérimentalement. C'est ainsi que la clinique ne perd pas ses droits devant les décisions du laboratoire.

Ce travail étant exclusivement personnel ne comporte pas de bibliographie; nous avons cité les auteurs auxquels nous avons emprunté des idées ou des faits.

Vu : le Président,
DUPRÉ

Vu : le Doyen,
H. ROGER

Vu et permis d'imprimer
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris
L. POINCARÉ

TABLE DES MATIÈRES